

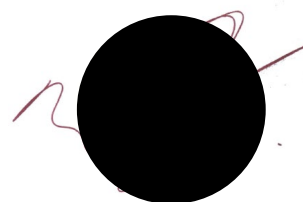
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ENFERMEDAD DE CHAGAS:

**INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS CARDIOLÓGICAS,
UTILIDAD DE LA RMN CARDIACA Y
USO COMBINADO “IN VITRO” DE BENZNIDAZOL Y
CORTICOIDE**

IRENE CARRILLO ACOSTA



Directores: Dr. D. Miguel Górgolas Hernández-Mora

Dr. D. Ramón Pérez Tanoira

Madrid, 2020

A mis padres y hermanos
A Jorge

AGRADECIMIENTOS

Después del arduo proceso que supone realizar una Tesis, toca escribir lo que sin duda alguna ha sido para mí la parte más difícil. Probablemente se deba a la falta de costumbre que tenemos de expresar lo que sentimos, a pesar de que se trate de una de las habilidades sociales más generosas y reconfortantes.

En primer lugar, quiero agradecerle este trabajo a todos y cada uno de los pacientes que se han ofrecido a participar. Su humanidad, su cariño y su incansable predisposición a ayudar de forma altruista han hecho que esto tenga sentido.

Mención especial a mi director de Tesis, el Dr. Miguel Górgolas por la confianza que ha depositado en mí para llevar a cabo este proyecto. Su sabiduría, su capacidad de resolución y su constancia, lo han convertido en un referente durante mi trayectoria profesional.

Debo reconocer por encima de todo el trabajo del Dr. Ramón Pérez Tanoira, mi mano derecha desde que comenzamos este proyecto, y sin duda alguna, un grandísimo compañero de trabajo que me llevo para siempre.

No puedo olvidar darle las gracias a mis compañeros y amigos. Al Dr. Alfonso Cabello, por su afán de superación, trabajo y paciencia infinita. A la Dra. Laura Prieto, por su profesionalidad. A Beatriz Álvarez, por sus consejos y cercanía. A Patricia Atencio, “mi compañera de batallas”. Al Dr. Manuel Fernández Guerrero, por sus conocimientos. Y a los Dres. Luis López, Antonio Núñez, Juan Gómez, Jorge Castillo, Elizabet Petkova, María Pavón y Silvia Rubio con los que he compartido mis años de formación, por haberme hecho en definitiva mejor profesional y mejor persona.

También a mis compañeros de Urgencias, en especial al Dr. Antonio Blanco y Dr. Joaquín García, por apoyarme y liberarme todo el tiempo necesario con el fin de acabar este proyecto.

No puedo olvidar agradecer la ayuda recibida por mi tutor, el Dr. Jorge Polo, al que recuerdo y recordaré toda mi vida como un médico ejemplar.

Al Dr. Jerónimo Farré, por introducirme en el mundo de la docencia enseñándome siempre a superarme un poco más tanto a nivel personal como profesional.

Destacar a mis compañeras de la Facultad de Farmacia. Es indescriptible la perfección y seriedad con la que llevan a cabo su trabajo. Gracias Cris por compartir tus conocimientos y tu paciencia durante tantas y tantas tardes, abriéndome los ojos al maravilloso mundo de la investigación.

A mis amigas “de toda la vida”, a mis amigos de “la Campus” y a mis “Conchitas” que me han acompañado durante todos estos años recibiendo únicamente palabras de admiración y cariño. Gracias.

A mi familia, a los que están y a los que estuvieron. A mis abuelos, tíos, primos y cuñada, por su amor incondicional. Siento que soy increíblemente afortunada de tener la familia que tengo.

A Jorge, por llegar y quedarse dándole sentido a muchos aspectos de mi vida. Por demostrarme que la distancia no es el olvido y que el AMOR puede ser fácil y no por eso ser menos amor.

A mis hermanos, Alberto y Jero, mi chute de ilusión y energía. En definitiva ellos son los que están, y curan.

Por ultimo y no por ello menos importante, quiero darle las gracias más sinceras a mis padres, Jero y Lola, a quien debo todo lo que soy. Por enseñarme que los grandes triunfos se consiguen con pequeños y constantes pasos, y que todo se reduce a lo esencial: amor.

ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

ARTÍCULOS

- Artículo aceptado:

Acosta IC, Pérez-Tanoira R, Prieto-Pérez L, Úbeda AC, Álvarez Álvarez B, Antoranz PA, et al. Chagas' heart disease: Descriptive analysis of 141 patients in a hospital of Madrid, Spain. *Travel Med Infect Dis.* 2020;(April). DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101690

COMUNICACIONES ORALES A CONGRESOS Y POSTERS

- Póster: “Aspectos epidemiológicos y clínicos del Chagas importado en un hospital de Madrid”. Presentado en el congreso anual de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo, 2017
- Póster: “Tolerance of treatment of Chagas disease“. European Congress on Tropical Medicine and International Health. Belgium. October, 2017
- Póster: “Epidemiological and clinical characteristics of imported Chagas disease in a hospital in Madrid”. European Congress on Tropical Medicine and International Health. Belgium. October, 2017
- Póster: “Efecto “in vitro” de los esteroides sobre la actividad en cultivos del trypanosoma cruzi”. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Bilbao. Octubre, 2017
- Comunicación oral: “Terapia combinada con nifurtimox y corticoides en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. ensayo in vivo con ratones”. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Bilbao. Octubre, 2017
- Comunicación oral: “Prevalencia de enfermedad de Chagas en mujeres gestantes nacidas en área endémica. Estudio multicéntrico de la Comunidad Autónoma de Madrid”. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Bilbao. Octubre, 2017

- Póster: “Aspectos epidemiológicos y tolerancia al tratamiento en pacientes con enfermedad de Chagas en un hospital de Madrid”. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao. Mayo, 2018
- Comunicación oral: “Prevalencia de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas en Madrid: Estudio transversal multicéntrico, 2011-2016”. Congreso de la Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria (SESPAS). Oviedo. Septiembre, 2019
- Comunicación oral: “Afectación cardíaca en la enfermedad de Chagas en un país no endémico”. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Ávila, 2019

OTROS MÉRITOS

Colaboradora docente en el Máster Propio de Medicina Tropical y Salud Internacional impartido en la Universidad Autónoma de Madrid durante los años 2017-2020

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.....	III
ÍNDICE	V
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	XI
SUMMARY	XIII
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1 HISTORIA	1
1.2 PARÁSITO	3
1.2.1 Taxonomía	3
1.2.2 Nomenclatura: DTU (Unidades discretas de tipificación)	4
1.2.3 Morfología y estructura	5
1.3 VECTOR.....	9
1.4 CICLO BIOLÓGICO	12
1.5 EPIDEMIOLOGÍA	13
1.6 FORMAS DE TRANSMISIÓN.....	15
1.6.1 Transmisión vectorial	15
1.6.2 Transmisión no vectorial	17
1.7 FORMAS CLÍNICAS	19
1.7.1 Fase aguda	19
1.7.2 Fase crónica	21

1.7.3 Reactivación e inmunosupresión	32
1.8 DIAGNÓSTICO	33
1.8.1 Métodos parasitológicos	34
1.8.2 Métodos serológicos	37
1.9 TRATAMIENTO.....	39
1.9.1 Indicaciones terapéuticas	40
1.9.2 Dosis terapéuticas	42
1.9.3 Tratamientos específicos.....	43
1.9.4 Tratamientos sintomáticos	47
1.9.5 Nuevos tratamientos.....	51
2- OBJETIVOS.....	55
3- MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
3.1 SERIE CLÍNICA.....	59
3.1.1 Población de estudio	59
3.1.2 Interpretación pruebas cardiológicas	59
3.1.3 Interpretación pruebas digestivas.....	63
3.1.4 Estudio microbiológico: test serológicos y PCR.....	64
3.1.5 Análisis de datos: estadística.....	65
3.1.6 Consideraciones éticas	65
3.2 ENSAYO EXPERIMENTAL “IN VITRO”	65
3.2.1 Mantenimiento de cultivos celulares.....	66
3.2.2 Mantenimiento de cultivos de epimastigotes	66
3.2.3 Obtención de amastigotes intracelulares	67
3.2.4 Ensayos de actividad “in vitro”	67
4- RESULTADOS	77
4.1 SERIE CLÍNICA.....	77
4.1.1 Datos epidemiológicos.....	77

4.1.2 Datos clínicos.....	77
4.1.3 Pruebas cardiológicas	81
4.1.4 Pruebas digestivas.....	94
4.1.5 Pruebas de diagnóstico microbiológico	97
4.1.6 Tratamiento.....	99
4.2 TRABAJO EXPERIMENTAL	101
4.2.1. Resultados ensayos de actividad “in vitro”	101
5- DISCUSIÓN	109
5.1 DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	109
5.2 DATOS CLÍNICOS.....	111
5.3 PRUEBAS CARDIOLÓGICAS.....	114
5.4 PRUEBAS DIGESTIVAS.....	121
5.5 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	123
5.6 TRATAMIENTO	125
5.6.1 Empleo de corticoides en pacientes con infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	127
5.7 LIMITACIONES.....	131
6- CONCLUSIONES.....	135
7- BIBLIOGRAFÍA	139
8- ANEXO	178

ABREVIATURAS

%AE: Porcentaje de actividad en epimastigotes.

%AA: Porcentaje de actividad en amastigotes intracelulares.

Ac: Anticuerpo.

AD: Aurícula derecha.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Ag: Antígeno.

AI: Aurícula izquierda.

AV: Auriculoventricular.

BRD: Bloqueo de rama derecha.

BRI: Bloqueo de rama izquierda.

BZ: Benznidazol.

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50.

CPRG: Rojo de clorofenol beta-D galactopiranósido.

DAI: Desfibrilador automático implantable.

DMSO: Sulfóxido de dimetilo.

DS: Desviación estándar.

DSVI: Disfunción sistólica ventricular izquierda.

DTU: *Discrete typing unit* (Unidades discretas de tipificación).

EA: Extrasístoles auriculares.

ECG: Electrocardiograma.

EGD: Esofagogastroduodenal.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EV: Extrasístoles ventriculares.

FEVD: Fracción eyección ventrículo derecho.

FEVI: Fracción eyección ventrículo izquierdo.

HAI: Hemibloqueo anterior izquierdo.

HAI: Hemoaglutinación indirecta.

HVI: Hipertrofia ventricular izquierda.

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IFN- γ : Interferón gamma.

Ig G: Inmunoglobulina G.

IL-10: Interleucina 10.

LIT: *Liver Infusion Tryptose*.

MCP: Marcapasos.

MEM: *Minimal Essential Medium*.

MMII: Miembros inferiores.

MPRD: Metilprednisolona.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

NX: Nifurtimox.

NYHA: *New York Heart Association*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: *Phosphate-buffer saline*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCRk: Reacción en cadena de la polimerasa de ADN de kinetoplasto.

PCRsat: Reacción en cadena de la polimerasa de ADN satélite.

PRD: Prednisona.

RGE: Reflujo gastroesofágico.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SBF: Suero bovino fetal.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SNC: Sistema nervioso central.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*.

TDC: Tripomastigotes derivados de cultivo celular.

VD: Ventrículo derecho.

VI: Ventrículo izquierdo.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPN: Valor predictivo negativo.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es definida por la organización mundial de la salud (OMS) como una enfermedad infecciosa tropical desatendida y potencialmente mortal, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, y transmitida principalmente de forma vectorial a los humanos por las heces de insectos triatomíneos. En las últimas décadas, España se ha convertido, después de los Estados Unidos, en el país de área no endémica con más número de casos potenciales de enfermedad, y se calcula que entre 6.000 y 30.000 pacientes padecerán cardiomiopatía chagásica en los próximos años. La evolución de esta afectación cardíaca es difícil de predecir, y los hallazgos observados son muy variables a lo largo de toda la enfermedad. Además, el tratamiento tripanocida tiene una eficacia muy limitada y una tolerancia que está muy lejos de ser ideal, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos es uno de los grandes retos que presenta esta enfermedad.

El objetivo principal de esta tesis consiste en estudiar las características clínicas y epidemiológicas de la población con enfermedad de Chagas que es atendida en un hospital español de tercer nivel, describir las alteraciones cardiológicas que presentan y determinar el papel de la resonancia magnética nuclear cardíaca (RMN) en su valoración. Por otro lado, se pretende evaluar, *in vitro*, la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de benznidazol combinado con corticosteroide, dado que este último podría reducir los efectos adversos secundarios al tratamiento.

Para ello, se ha realizado el seguimiento de los pacientes con enfermedad de Chagas atendidos en el hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid desde enero de 2009 a diciembre de 2018 recogiendo los resultados del electrocardiograma (ECG), ecocardiograma transtorácico (TT) y RMN cardíaca. Por otro lado, se ha valorado el efecto de los corticosteroides frente a las formas epimastigote y amastigote de *T. cruzi* mediante un estudio “*in vitro*” realizado en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid.

Se analizaron 147 pacientes con una edad media de 42,6 años, de los cuales el 92,5% eran de origen boliviano y cuya transmisión en el 96,6% de los casos fue vectorial. La RMN cardíaca se realizó a 52 pacientes (35,4%), de los cuales 14 (26,9%) presentaban alguna

alteración, principalmente hipocinesia global o segmentaria, dilatación de cavidades y retención patológica de gadolinio con realce miocárdico sugestiva de fibrosis cardiaca. Un 8,3% de los pacientes que referían estar asintomáticos con un ECG y un ecocardiograma TT normal terminaban mostrando una RMN cardiaca patológica ($p=0.144$). Sólo se detectaron alteraciones en el 17,6% de los enfermos a los que se les había realizado una única prueba cardiológica, mientras que este porcentaje aumentó hasta el 56,9% en los individuos que tuvieron un estudio más completo con tres pruebas cardiológicas (ECG, ecocardiograma y RMN), hallándose alteraciones que sugerían cardiopatía estructural resultando estadísticamente significativo con una $p < 0,05$.

Los ensayos experimentales han mostrado que la metilprednisolona, en concentraciones muy elevadas, carece de actividad frente los epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* pero, por el contrario, en combinación con benznidazol presenta un efecto negativo no pudiendo afirmar que el benznidazol conserve su actividad parasiticida en combinación con el corticoide.

En conclusión, la RMN es más sensible que otras pruebas cardiológicas para la determinación precoz de la cardiopatía estructural.

SUMMARY

Chagas disease, or American tripanosomiasis, is defined by the World Health Organization (WHO) as an unattended and life-threatening tropical infectious disease, caused by the *Trypanosoma cruzi* protozoan, and transmitted primarily to humans by vector feces. triatomine insects In recent decades, Spain has become, after the United States, the country with a non-endemic area with the highest number of potential cases of disease, and it is estimated that between 6,000 and 30,000 patients will suffer from chagasic cardiomyopathy in the coming years. The evolution of Chagas cardiomyopathy is difficult to predict, and the observed findings vary widely throughout the disease. In addition, today the tolerance and efficacy of trypanocidal treatment is far from ideal, and the search for new drugs is a great challenge.

The main objective of this thesis is to study the clinical and epidemiological characteristics of the population, describe cardiological alterations and determine the role of cardiac MRI. On the other hand, and since the incorporation of a corticosteroid can reduce the adverse effects secondary to benznidazole treatment, we have carried out a series of experimental trials "in vitro" in order to evaluate its activity against the *T. cruzi* parasite.

For this, data collection and monitoring of patients treated in a tertiary university hospital in Madrid from 2009 to 2018 was carried out, describing the main characteristics and data of the electrocardiogram (ECG), transthoracic echocardiogram (TT) and cardiac magnetic resonance (NMR) In parallel, the successive experiments were performed with the epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, in the Department of Parasitology of the Faculty of Pharmacy at the Complutense University of Madrid.

According to our results, 147 patients with an average age of 42.6 years were analyzed, of which 92.5% were from Bolivia and whose transmission in 96.6% of the cases was vectorial. Cardiac MRI was performed on 52 patients (35.4%), of which 14 (27%) presented some alteration, mainly global or segmental hypokinesia, cavity dilatation and pathological retention of gadolinium with myocardial enhancement suggestive of cardiac fibrosis. 8.3% of those who reported being asymptomatic with an ECG and a normal TT echocardiogram ended up showing a pathological cardiac MRI, considering that this association was not statistically significant, probably due to the small sample size ($p =$

0.144). Only 17.6% with a single cardiology test had alterations, but if we take into account patients who had a more complete study with three cardiological tests (ECG, echocardiogram and MRI), the percentage increased to 56.9% with findings pathological that suggested structural heart disease ($p < 0,05$).

Experimental tests have shown that, when in high concentration, methylprednisolone lacks activity on the epimastigotes and amastigotes of *T. cruzi*, but on the contrary, in combination with benznidazole, it has a negative effect and it cannot be stated that benznidazole maintains its parasitocidal activity when paired with the corticosteroid.

In conclusion, MRI is more sensitive than other cardiological tests for the early diagnosis of structural heart disease.

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una patología causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, y que afecta fundamentalmente a países de América Latina. En las últimas décadas y debido a los movimientos migratorios se ha observado un aumento de casos en los Estados Unidos de América, Canadá, Europa y algunos países del Pacífico occidental. España se ha convertido, después de los Estados Unidos, en el país de área no endémica con más casos potenciales de la enfermedad.

1.1 HISTORIA

Estudios recientes sugieren que *Trypanosoma cruzi* se introdujo en América del Sur a partir de un tripanosoma de murciélago hace aproximadamente unos 7-10 millones de años (1). La detección de ADN de *T. cruzi* en tejido muscular, cardíaco y digestivo de cuerpos humanos momificados de 9.000 años de antigüedad sugieren que la enfermedad de Chagas, en humanos, se originó en el desierto de Atacama tras los primeros asentamientos (1–3). Desde el siglo XVI existen múltiples informes que describen diversa sintomatología que podría hacer referencia a la enfermedad de Chagas (4). Años más tarde, Charles Darwin (1809-1882) describió el vector triatomino o chinche besucón e incluso hay indicios de que probablemente él mismo muriera de la enfermedad (5).

A principios del siglo XX, en 1907, el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) (Figura 1), investigador médico brasileño, fue enviado a trabajar en una campaña antipalúdica en la vía del Ferrocarril Central de Brasil. Vivía en Lassance, a orillas del río Picudo. Allí trabajaba y dormía dentro de un tren, en un vagón tenía su consultorio y en otro tenía un pequeño laboratorio. Fue en este lugar, donde supo por un ingeniero ferroviario de la existencia de un insecto hematófago de hábitos nocturnos al que llamaban barbeiro, por su preferencia a picar en zonas de piel delgada (6).

Carlos Chagas decidió estudiar estos insectos hematófagos del subgénero *Triatoma* que infestaban las viviendas de barro y paja. Capturó e identificó correctamente al insecto *Panstrongylus megistus*, y halló en su intestino numerosos tripanosomas, dándoles el

nombre de *Schizotrypanum cruzi* inicialmente y *Trypanosoma cruzi* posteriormente en honor a su mentor Oswaldo Cruz (1872-1917) (1). Fue este último, quien consiguió reproducir la infección por *T. cruzi* poniendo en contacto triatominos infectados con monos tití. Se inocularon también otros monos, perros, conejos y cobayas, y en todos se observó posteriormente el parásito sanguíneo. Pero no fue hasta el 14 de Abril de 1909, cuando Carlos Chagas detectó la presencia de este parásito en la sangre de un paciente de



Figura 1: Carlos Chagas en su laboratorio en el Instituto Federal en Manguinhos, Río de Janeiro.

Fuente: Biblioteca virtual Carlos Chagas
(www.bvschagas.coc.fiocruz.br).

2 años de edad que presentaba un cuadro clínico compatible con la fase aguda de la enfermedad (6). Más tarde, en 1912 C. Chagas detectó nuevamente el parásito en un armadillo, y progresivamente en otros animales selváticos que actuaban como reservorios de la enfermedad (1). Para completar su trabajo sobre la patología de la nueva enfermedad, C. Chagas describió 27 casos de la enfermedad en la fase aguda y realizó más de 100 autopsias a pacientes que presentaban la forma crónica.

Por todo esto, está claro que el Dr. Carlos Chagas ha sido el principal descubridor de esta enfermedad, describiendo por primera vez su agente etiológico, reservorio y vector, junto con algunos aspectos clínicos (1)(7). Por ello, en 1912 recibió el premio alemán SHAUDIN, que se otorga al mejor trabajo en el campo de la Parasitología y la Medicina Tropical en todo el mundo y, posteriormente, fue nominado en dos ocasiones (1913 y 1921) al Premio Nobel, sin ser ganador de ninguno de ellos (8)(9).

Ha habido también otros investigadores que han tenido un papel muy relevante en la caracterización de esta enfermedad. El patólogo brasileño Gaspar de Oliveira Vianna (1885-1914), describió el papel del amastigote dentro del ciclo biológico intracelular del parásito, tanto en las células del corazón como en las del músculo esquelético (10). El parasitólogo francés Alexandre J. Émile Brumpt (1877-1951) estableció que la infección por *T. cruzi* se adquiere por la contaminación de la herida con las heces que deposita el insecto durante la mordedura, y no por la propia inoculación como se pensaba hasta ese momento (1).

Más tarde en 1930, Salvador Mazza (1886-1946) confirmó la existencia de la enfermedad en Argentina, tras realizar varias expediciones a los departamentos de Potosí, Tarija, Cochabamba, Chuquisaca, La Paz y el Beni (7), describiendo más de mil casos (1) e indicando la posibilidad de transmisión por vía transfusional (9). Posteriormente, fundó la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA), realizando múltiples estudios sobre dicha patología y otras enfermedades endémicas que afectaban principalmente a las zonas rurales, iniciando así importantes campañas de prevención sanitaria. Por último, no podemos dejar de mencionar a Cecilio Romana, quien relacionó una inflamación unilateral periorbitaria que tiene lugar en la fase aguda con la posible puerta de entrada del parásito (11).

A lo largo de la historia, hemos aprendido que el flujo migratorio de pacientes infectados con *T. cruzi* ha llevado a una extensa distribución de la enfermedad de Chagas desde América Latina a países no endémicos como Europa, América del Norte y la región del Pacífico occidental (1).

1.2 PARÁSITO

El agente causante de la enfermedad de Chagas es un parásito intracelular denominado *Trypanosoma cruzi*, caracterizado por una alta diversidad genética y fenotípica (12).

1.2.1 Taxonomía

Su clasificación taxonómica es la siguiente (13):

- Reino: *Protista*.
- Subreino: *Protozoa*. Descritos como organismos eucariotas unicelulares (16).
- Phylum: *Sarcomastigophora*. Su locomoción se realiza por medio de flagelos y/o pseudopodios. Poseen un único tipo de núcleo (17).
- Sub-phylum: *Mastigophora*. Presentan un pequeño número de flagelos y se reproducen por fisión binaria y en algunos grupos por reproducción sexual (18).
- Clase: *Zoomastigophorea*. Sin cloroplastos, con uno o varios flagelos, reproducción sexual conocida en pocos grupos, grupo prolífico (19).

- Orden: *Kinetoplastida*. Tienen de uno a cuatro flagelos, una única mitocondria y generalmente un organelo autorreplicante que es en realidad una prolongación capsular de la mitocondria, denominada kinetoplasto. El aparato de Golgi está ubicado en la zona de la depresión flagelar. Hay especies parásitas y otras de vida libre (20).
- Suborden: *Trypanosomatina*. Presentan un único flagelo, libre o con membrana ondulante, el kinetoplasto es pequeño y compacto.
- Familia: *Trypanosomatidae*. En esta familia encontramos varios miembros monogénéticos (con un solo huésped), todos parásitos de invertebrados, y otros digénéticos (con más de un huésped) que alternan huéspedes vertebrados e invertebrados (21).
- Género: *Trypanosoma*. Se dividen en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el consecuente método de infección en el huésped vertebrado (22).
- Sección: *Estercoraria*. Incluye tripanosomas cuyo ciclo de desarrollo en el vector invertebrado se completa en la región del tubo digestivo del mismo. Se transmiten por contaminación a través de las heces del insecto.
- Especie: *Trypanosoma cruzi* (1).

1.2.2 Nomenclatura: DTU (Unidades discretas de tipificación)

Para evitar que la diversidad bioquímica, genética y biológica existente entre las diferentes cepas de *T. cruzi* fuese descrita de una forma demasiado compleja, en 2009 se alcanzó un consenso para que las cepas de este parásito fuesen clasificadas en seis DTU (14). Las DTU son “conjuntos de poblaciones genéticamente relacionadas entre sí y que se identifican por marcadores comunes de tipo genético, molecular o inmunológico” (15). Existe un guía establecida en la que se muestra cada una de las cepas "experimentales" con su DTU correspondiente (Tabla 1) (14,16).

Tabla 1: Unidades discretas de tipificación empleadas para denominar las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. 2009 (14).

DTU asignado	Abreviación	Equivalencia
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I y DTU I
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II y DTU II
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU II y <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3, Z3-B y DTU II
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Z2 Boliviano, rDNA 1/2, clonet 39 y DTU II
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Z2 Paraguayo, B Zymodeme y DTU II

DTU: Discrete typing unit (Unidades discretas de tipificación). Tc: *T. cruzi*.

1.2.3 Morfología y estructura

Trypanosoma cruzi muestra diferentes morfologías durante su ciclo de vida que pueden ser identificadas a través de la microscopía óptica (Figura 2). Dichas formas son:

- Epimastigote: alargado (20-40 μm) y con el kinetoplasto localizado anterior al núcleo. Es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los invertebrados y en medios de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Esta forma es capaz de dividirse y se observa en el intestino del vector (17).
- Tripomastigote: también alargado (25 μm de longitud y 2 μm de diámetro), pero con el kinetoplasto localizado posterior al núcleo. Se encuentra en las células de los tejidos y la sangre de los hospedadores vertebrados; en el intestino posterior, heces y orina del huésped invertebrado; en cultivos en fase estacionaria de crecimiento; y en la fase líquida de los cultivos celulares. Esta forma en concreto, no se divide (18).
- Amastigote: esférico u ovalado. Posee el flagelo más corto, envuelto por la propia bolsa flagelar. Esta forma es intracelular y tiene capacidad para dividirse (18).

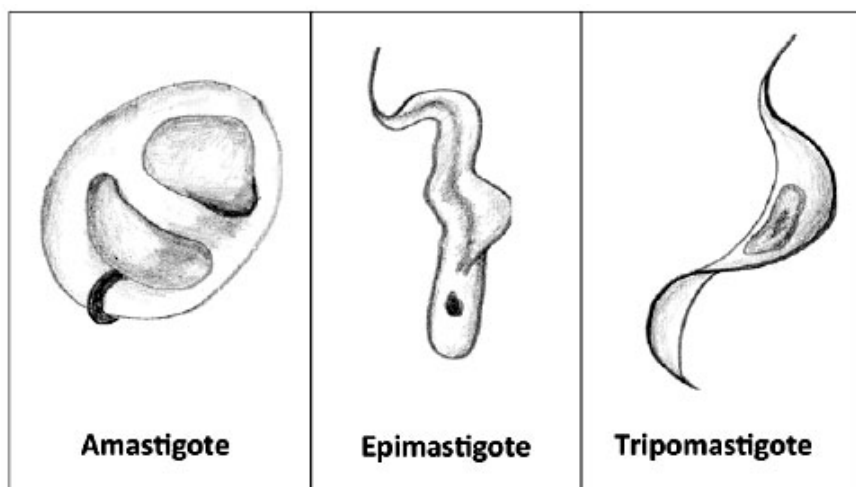


Figura 2: Formas celulares de *T. cruzi* (19).

Con respecto a su organización estructural encontramos las siguientes partes (Figura 3 y 4):

- Superficie celular: Incluye la bicapa lipídica y el glicocáli. Las moléculas más importantes que se encuentran en dicha superficie son las mucinas, transialidasas y las glicoproteínas Tc85 (20).

La superficie celular de este parásito se caracteriza por ser más delgada que la de otros parásitos como *Trypanosoma brucei* (21). Además, esta superficie en el caso de los tripomastigotes, presenta una rugosidad que se debe a las proteínas expuestas.

El uso de técnicas convencionales como la criofractura permitió observar la densidad y distribución heterogénea de la membrana y con mayor precisión la identificación de tres macrodominios como el cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar (22). Y dentro de estos macrodominios existen unos microdominios que son los siguientes: el collar flagelar y la zona de unión del flagelo al cuerpo celular, la región del citostoma. El citostoma es una estructura rodeada de microtúbulos subpeliculares, que se invagina profundamente siendo de gran importancia en la función de captación de macromoléculas a través de la endocitosis (23).

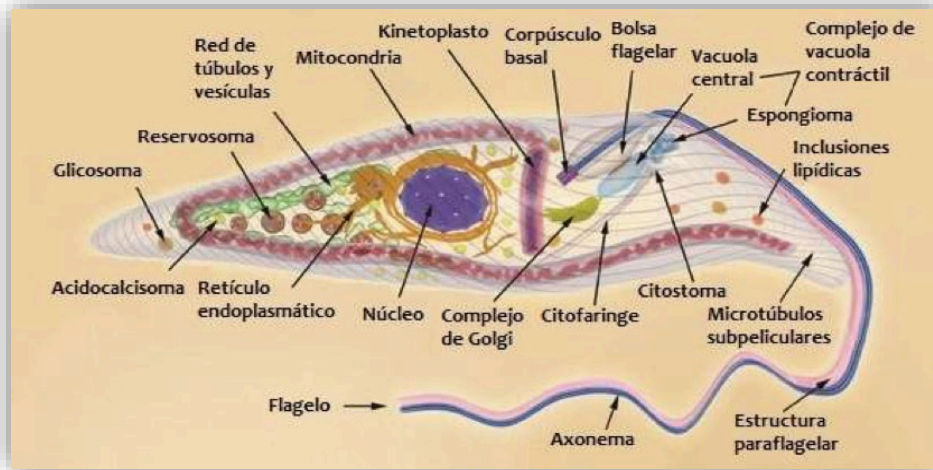


Figura 3: Morfología y estructura de *T. cruzi*. Fuente: (24)

- Flagelo: Está formado por nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central. A través de la microscopía electrónica, se observa una varilla paraflagelar, formada por filamentos unidos al axonema. Esta varilla está formada por múltiples proteínas, muchas de ellas no identificadas y de gran importancia, ya que son altamente antigénicas y pasan a ser el principal objetivo para la investigación de posibles vacunas o test de diagnóstico. Hasta ahora se reconoce como una parte estructural de gran relevancia y que además le confiere la capacidad de movilidad y adhesión a la superficie (23). El flagelo aparece lateralmente creando un movimiento y dando la sensación de membrana ondulante (25)
- Citoesqueleto: Es el conjunto de microtúbulos subpeliculares distribuidos de forma regular, con una separación constante, por todo el cuerpo del protozoo, excepto en el bolsillo flagelar (26). Entre estos microtúbulos se puede ver el retículo endoplásmico (23).
- Complejo kinetoplasto-mitocondria: El kinetoplasto es una estructura electrodensa ligeramente curva situada cerca del núcleo, y cuya organización varía según la etapa en la que se encuentre el protozoo. Además, contiene un tipo especial de ADN, conocido como K-DNA (ADN de kinetoplasto), que se encuentra dentro de la matriz mitocondrial, perpendicular al eje del flagelo. Este parásito contiene una mitocondria muy ramificada que ocupa gran parte del cuerpo celular (23).

- Núcleo: Está envuelto por una membrana porosa, que se mantiene intacta durante el momento de la división, presenta una cromatina diseminada por el nucleoplasma y un nucléolo (27).
- Glicosomas: Se comportan como estructuras periféricas rodeadas por una membrana y con una matriz homogénea que se distribuyen por todo el citoplasma. Gran parte del proceso de la glucólisis se produce en esta parte (18). Se relacionan con los peroxisomas por el origen evolutivo que presentan en común (23).
- Acidocalcisola: Orgánulo esférico situada en la periferia del parásito, capaz de transportar protones y calcio (28). Se encarga de almacenar múltiples componentes, incluyendo calcio, fósforo, sodio, potasio, zinc y hierro (29) y además de la homeostasis del pH y la osmorregulación. No todas las fases tienen la misma cantidad de esta estructura, siendo el amastigote la fase que más posee (25).
- Vacuolas: Está formada por varios túbulos, conectados a una vacuola central situada cerca del bolsillo flagelar (30). Contiene la aquaporina, una proteína encargada del transporte de agua, por lo que está involucrada en el proceso de osmorregulación (31).
- Inclusiones lipídicas: Estructuras esféricas que presentan un diámetro variable, localizadas en el citoplasma del parásito y rodeadas por una monocapa de fosfolípidos.
- Vía secretora: Formada por el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi y un sistema de vesículas que brotan de las cisternas de Golgi y migran hacia el bolsillo flagelar donde se fusionan y descargan su contenido. El complejo de Golgi tiene una morfología similar a la descrita en otras células y tiene implicación en la glucosilación de diferentes proteínas (32).

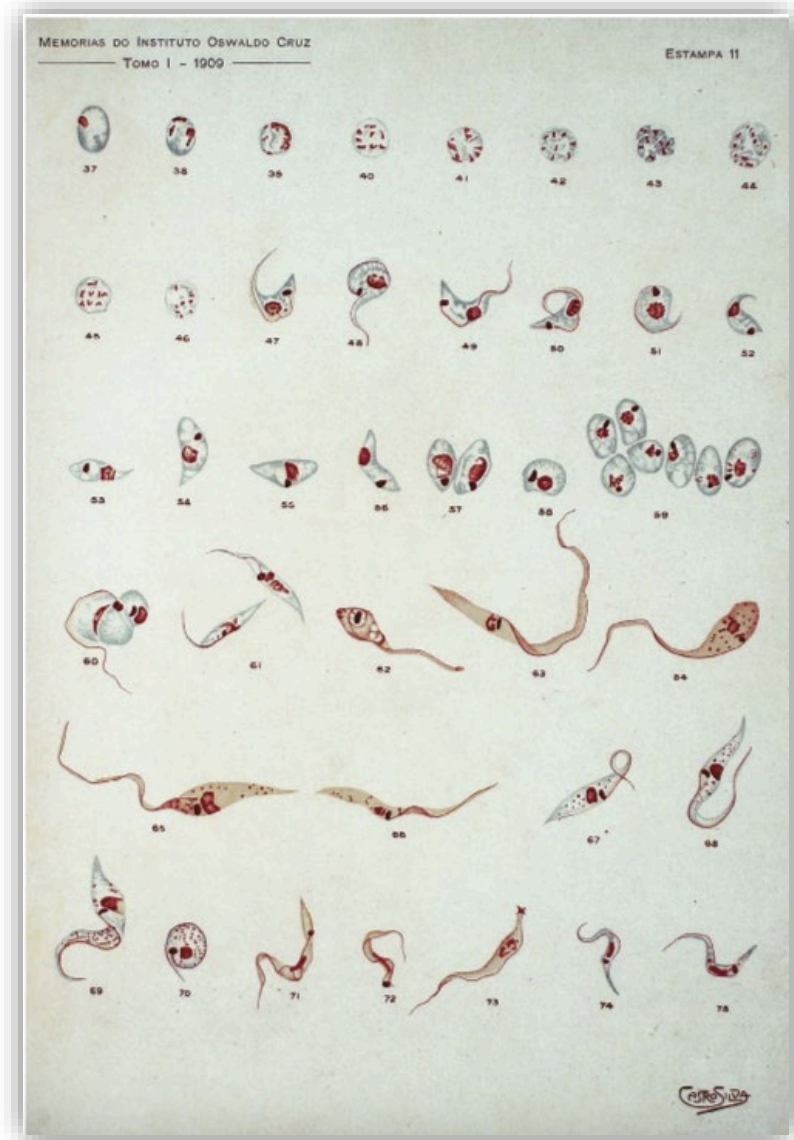


Figura 4: Reproducción de los dibujos originales de la primera descripción de *Trypanosoma cruzi* por Carlos Chagas en 1909 donde se observaron estadios de desarrollo encontrados en los hospedadores de invertebrados e invertebrados. Fuente: De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 2009;104(May):89–100 (23).

1.3 VECTOR

Los vectores portadores del *Tripanosoma cruzi* (Figura 5), son insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* y a la familia *Reduviidae* (Heteróptera), también conocidos como chinches o “insectos besadores”.



Figura 5: Insecto triatomino: vector de *Trypanosoma cruzi* (33).

El ciclo de vida del triatomino tarda desde huevo hasta adulto entre 3-6 meses dependiendo de la especie, pasando por cinco etapas ninfales (34). Todos los estadios pueden albergar y transmitir el *T. cruzi*, y la probabilidad de que un triatomino esté infectado aumenta de acuerdo con el número de tomas de sangre, de esta forma, los estadios mayores y los adultos tienden a tener las mayores tasas de infección (35).

En la actualidad, hay descritas más de 130 especies, siendo particularmente relevantes los pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, por la transmisión del parásito a los seres humanos. Estos tres géneros están ampliamente distribuidos en América Latina (Figura 6), desde México hasta Argentina y Chile, y se encuentran habitando tanto las zonas forestales como las zonas más secas (12)(36)(37).

Los vectores primarios más importantes son: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* (35).

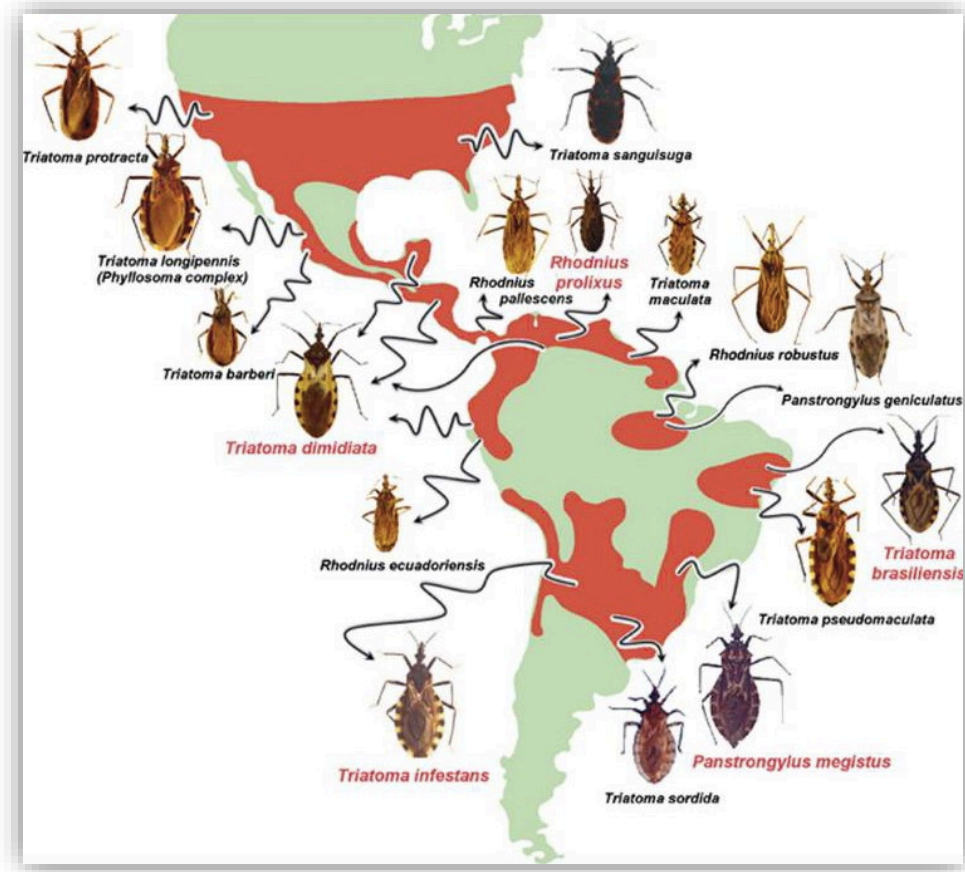


Figura 6: Distribución de las especies de triatominos más relevantes. (Las áreas rojas indican la distribución geográfica aproximada y las especies destacadas en rojo se consideran los vectores más importantes del parásito) (38).

Dichos insectos hematófagos, viven preferentemente en rincones y grietas de viviendas precarias hechas con material de adobe, y se infectan cuando se alimentan de un huésped mamífero que presenta tripomastigotes circulantes de *T. cruzi*. Normalmente ingieren gran cantidad de sangre, produciendo una intensa diuresis, una digestión lenta y ocasionalmente largos períodos de inanición. Los cambios resultantes en el entorno intestinal van a inducir el desarrollo de estadios dominantes de *T. cruzi* (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos), y pueden correlacionarse con la aparición de estadios específicos de desarrollo (esferomastigotes y células gigantes) que, de otro modo, rara vez se observan (39).

Los parásitos ingeridos se multiplican entonces en el tubo digestivo del insecto, y pueden ser transmitidos a un nuevo huésped tras la defecación del vector mientras ingiere sangre del hospedador vertebrado (35).

1.4 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico del *T. cruzi*, representa uno de los ciclos vitales más complejos debido a la participación de un huésped vertebrado y otro invertebrado. Comienza cuando el insecto triatomino infectado (vector), pica al hospedador mientras deposita sus heces en la piel de éste. Los tripomastigotes metacíclicos que se encuentran en las heces, se introducen por la herida producida tras la picadura, siendo posible también su entrada a través de la mucosa o conjuntiva (Figura 7) (12).

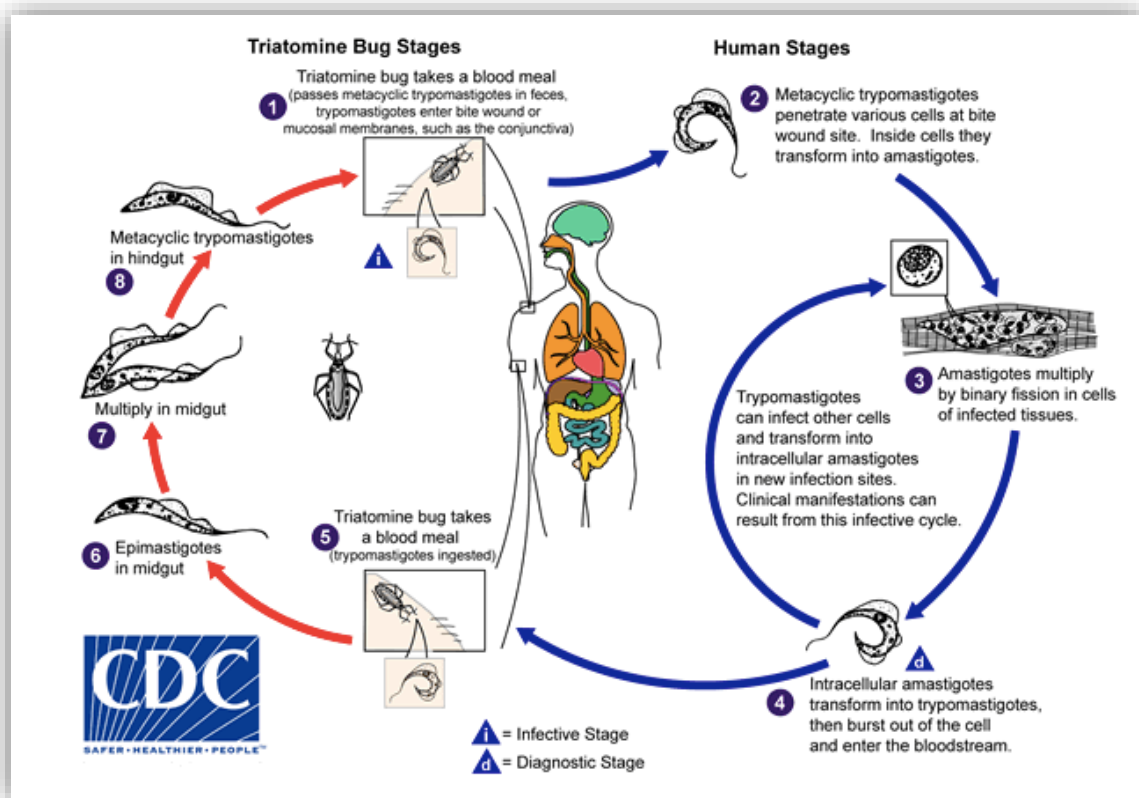


Figura 7: Ciclo biológico del *T. cruzi*. Fuente: www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html. CDC (33).

Una vez dentro del huésped vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos identifican las moléculas de superficie de las células (fibroblastos, macrófagos y células epiteliales del lugar de inoculación) y se produce la invasión o internalización celular. Ya en el citoplasma de la célula hospedadora, se diferencian en amastigotes y tras un periodo de quiescencia (20-35 horas) se inicia la multiplicación de éstos mediante división binaria, transformándose posteriormente en tripomastigotes (Figura 7) (40).

Tras la ruptura de la célula hospedadora, el tripomastigote se libera al torrente sanguíneo, dando lugar a un nuevo ciclo o permitiendo ser nuevamente ingerido por el vector. Es importante reseñar que los tripomastigotes que permanecen en el torrente sanguíneo no se replican, salvo si se introducen de nuevo en otra célula o son ingeridos por otro vector (33). La parte del ciclo que se produce en el insecto triatomino, comienza cuando éste ingiere tripomastigotes que circulan por el torrente sanguíneo tras tomar la sangre del vertebrado infectado (Figura 7). Una vez dentro, la mayoría de los tripomastigotes se lisan en el estómago del insecto (41).

Los tripomastigotes se transforman, pocos días más tarde, en epimastigotes. Estos migran al intestino donde se dividen intensamente, y es en el intestino delgado donde los epimastigotes se sitúan entre el contenido intestinal y la membrana. Una vez en el recto se produce la metaciclogénesis, dependiente de diferentes factores (pH, temperatura, estado nutricional del vector...), en la que la forma epimastigote se transforma en tripomastigote metacíclico (forma infectiva) que es transmitido a través de las heces del parásito (Figura 7) (39) (41).

1.5 EPIDEMIOLOGÍA

Es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo, y se distribuye principalmente en las zonas endémicas de 21 países de América Latina: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guayana Francesa, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Surinam, Uruguay y Venezuela (Figura 8) (42).

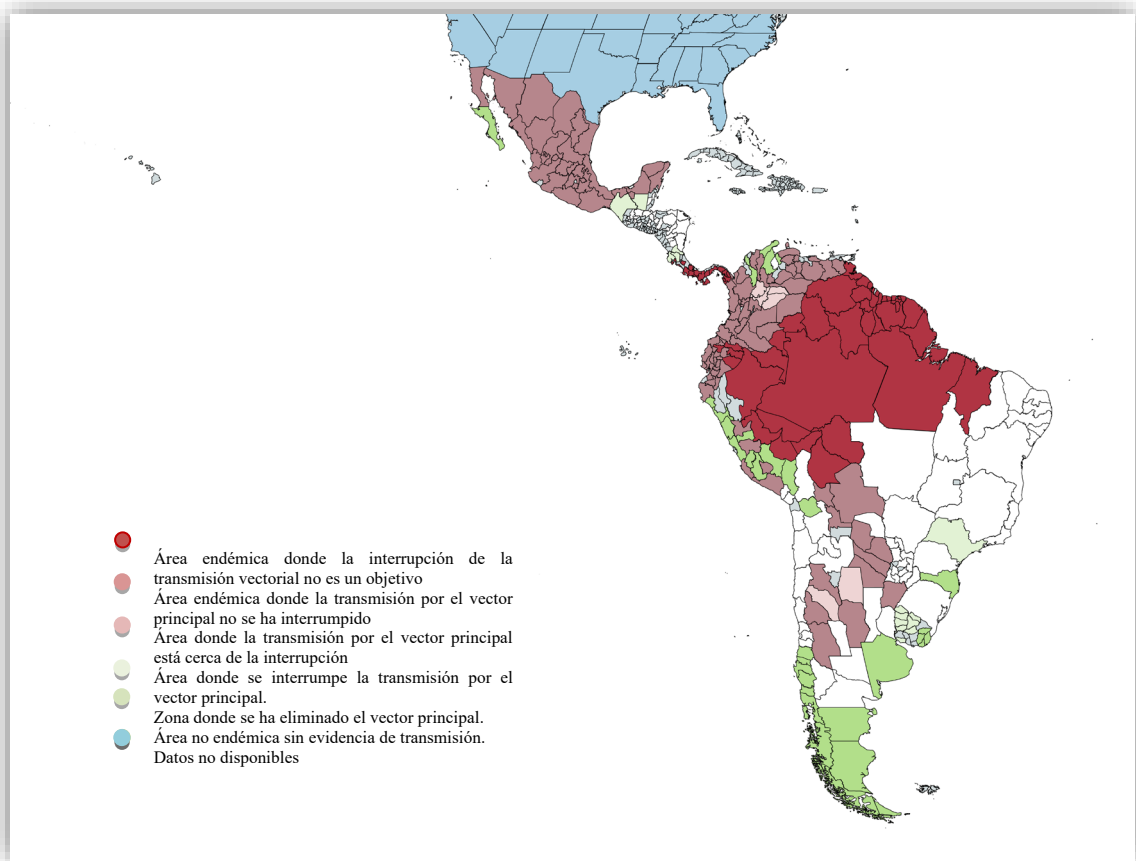


Figura 8: Transmisión de la enfermedad de Chagas por el vector principal, triatomino (septiembre de 2014) Adaptado del programa de control de la enfermedad de Chagas de la Organización Panamericana de la Salud Mundial (12).

Debido a los grandes movimientos migratorios que se han producido en las últimas décadas, se ha observado un aumento del número de casos en los Estados Unidos de América, Canadá, Europa y algunos países del Pacífico Occidental (43). Dicha migración y la forma de transmisión (incluyendo la forma congénita y transfusional), ha dado lugar a que esta enfermedad se propague más allá de sus límites geográficos y se convierta en un problema global (44).

Se calcula que en el mundo hay en torno a unos 6-7 millones de personas infectadas, siendo reconocida por la OMS como una enfermedad potencialmente mortal. Este número podría ser mucho mayor debido al gran número de casos infradiagnósticos (índice estimado de un 95%). Esto se puede deber tanto a los escasos síntomas que presentan la mayoría de los individuos clasificándose como portadores de la forma

indeterminada de la enfermedad (45), o a la escasa experiencia que presentan los profesionales sanitarios (33).

Actualmente, la incidencia es mayor en las zonas rurales donde las condiciones ambientales favorecen la reproducción de los insectos triatomíneos (principal forma de transmisión) (42)(46). Las personas que viven en casas infestadas están continuamente expuestas a picaduras de vectores, y la incidencia de infección por *T. cruzi* es de un 0,1% - 4% por año en regiones hiperendémicas, como el Chaco boliviano (47,48). La prevalencia de la infección por *T. cruzi* es más alta en Bolivia (6,1%), Argentina (3,6%), Paraguay (2,1%), Ecuador (1,4%), El Salvador (1,3%) y Guatemala (1,2%) (49).

A principios de 1990, se realizaron diferentes campañas (Fundación Nacional de Salud o la Iniciativa Cono Sur), para el control de la enfermedad, a través de programas que actuaban frente a la erradicación de vectores y cribado obligatorio en los bancos de sangre (36)(37)(50). El éxito de estas campañas fue tan impresionante que algunos países han sido certificados libres de transmisión por dicha vía, incluyendo Uruguay (1997), Chile (1999) y gran parte de Brasil (2000) (37,51). A pesar de esto, se siguen describiendo nuevos casos en forma de brotes en la cuenca del Amazonas a causa de la transmisión oral (52).

Actualmente, la prevalencia de infección en los migrantes latinoamericanos que residen en Europa se estima en torno a un 4,2% (IC del 95% 2,2 – 6,7), destacando la procedencia boliviana (53). España se considera el segundo país de área no endémica con mayor número de casos de enfermedad de Chagas (54), después de Estados Unidos, donde se calcula que aproximadamente unas 300.000 personas puedan estar infectadas por *T. cruzi* (19).

El coste anual estimado en atención médica por morbilidad, asociada a esta enfermedad, es de 627,46 millones de dólares y 806.170 años de vida ajustados (12).

1.6 FORMAS DE TRANSMISIÓN

1.6.1 Transmisión vectorial

La vía más común de transmisión es la vectorial (80% de los casos) (Figura 9) (55).



Figura 9: Insecto de la especie *Triatoma infestans* picando (56).

Triatoma infestans es el vector más importante, principalmente localizado en la región sub-Amazónica (Sudamérica). Otros vectores relevantes son: *Rhodnius prolixus*, se encuentra fundamentalmente en el norte de América del Sur y América Central, y *Triatoma dimidiata*, ocupando una zona similar pero extendiéndose además hacia México (12).

El control vectorial es una importante herramienta en áreas de alta endemicidad. En Brasil y en otros países de América del Sur, Centroamérica y la cuenca Amazónica, los programas multicéntricos coordinados han llevado a una reducción del 70% en el número de nuevas infecciones (57). Sin embargo, debido a que la eficacia de los insecticidas no es permanente (58) y a las posibles resistencias al propio insecticida (59), la reinfestación por triatomíneos es uno de los principales desafíos en áreas endémicas que obligan a mantener activos los programas de control de vectores (60).

En Estados Unidos se han reportado algunos casos autóctonos: en el este de Estados Unidos (*Triatoma sanguisuga*), en el centro de Texas y también en México (*Triatoma gerstaeckeri*), Arizona y California (*Triatoma protacta* y *Triatoma rubida*) (61) (62). Se estima que un 20 % de estos vectores presentes en Estados Unidos están infectados. La explicación del bajo número de casos de transmisión vectorial que tiene lugar en este país se puede deber a que estos vectores defecan entre 10-20 minutos tras la picadura, por lo que sucede lejos de la vía de entrada al ser humano, a las buenas condiciones en la vivienda y adecuados hábitos higiénicos y alimentarios (19).

1.6.2 Transmisión no vectorial

Otros mecanismos de transmisión menos frecuentes en zonas endémicas, pero con mayor relevancia en los países no endémicos o zonas urbanas, son los siguientes:

Transmisión congénita

Ocurre en más del 5% de los embarazos en mujeres con infección crónica en algunas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay, y en menos del 2% en la mayoría de los otros países endémicos. Puede ocurrir tanto en la fase aguda como crónica de la madre, así como en cualquiera de sus embarazos (37)(63)(64)(35).

Según algunos estudios, el porcentaje de transmisión congénita depende de diversos aspectos que incluyen los niveles de parasitemia de la madre, la cepa de *T. cruzi* y de los diferentes factores placentarios. Además, la reducción de la producción de interferón gamma (IFN- γ) durante el embarazo, se relaciona con mayores tasas de neonatos infectados en contraste con la mayor activación de monocitos en las madres que no transmitieron el parásito a sus hijos (65).

Desde 1987 la OMS ha recomendado la quimioterapia preventiva (benznidazol o nifurtimox) para mujeres en edad fértil con esta enfermedad a pesar de su alta toxicidad. Esto tiene como principal objetivo reducir la carga parasitaria, que asciende significativamente durante el tercer trimestre de embarazo, pudiendo explicar los casos de partos prematuros o recién nacidos con bajo peso, así como el riesgo de transmisión congénita (65).

La implementación y disponibilidad de pruebas diagnósticas más sencillas y accesibles, en torno a la atención primaria en centros de salud, podría reducir tanto el porcentaje de transmisión congénita como el tiempo de iniciar un adecuado manejo terapéutico (66).

Transmisión sanguínea

El riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas a partir de la transfusión de una unidad de sangre de un donante infectado con *T. cruzi* es inferior al 20%, y depende de varios factores como: el tipo de componente sanguíneo transfundido, la parasitemia del donante, el estado inmunológico del receptor o la cepa de *T. cruzi* (67)(68)(69). Por ejemplo, la

transfusión de plaquetas conlleva mayor riesgo de infección que otros componentes sanguíneos (35).

El control de los donantes de sangre en España fue regulado mediante el Real Decreto sobre hemodonación (Real Decreto 1088/2005) y promulgado a finales del 2005. A raíz de esto, en los centros transfusionales de España, se implanta el cribado serológico para todos los donantes procedentes de zona endémica, excluyendo así los donantes con enfermedad de Chagas (70).

Transmisión oral

Ocurre por la ingesta de alimentos contaminados con heces de insectos vectores o secreciones de reservorios silvestres contaminadas. Se ha relacionado con alimentos como la fruta, el jugo de caña de azúcar o el agua en Brasil, y con los jugos de guayaba, naranja o mandarina en Colombia y Venezuela (19). Estos casos se confirmaban tras la aparición de un cuadro clínico agudo compatible con la infección, la presencia del parásito tras un examen microscópico en sangre o fluido biológico junto con el consumo de algún alimento sospechoso (71).

Hasta 2004 se habían publicado pocos casos, sin embargo, después de un brote inicial que ocurrió en el estado de Santa Catarina (Brasil) en 2005, se han reportado nuevos brotes, especialmente en la región norte de Brasil donde el consumo de bayas frescas es frecuente. En 2006 en el estado de Pará (Brasil), la transmisión oral fue responsable de 178 casos agudos de enfermedad de Chagas. Como consecuencia de todos estos brotes, las autoridades brasileñas implantaron medidas estrictas de control alimentario (72)(73).

Transmisión por trasplante de órganos

Existe la posibilidad de contagio por dicha vía, aunque la implantación de protocolos de cribado en los últimos años ha generado un mayor control de los donantes con infección crónica (70). Actualmente, existen algunos casos documentados en Latinoamérica, así como en EEUU, Canadá y Europa debido a la gran cantidad de inmigrantes procedentes de zona endémica (35).

Transmisión por accidente

Durante la década de 1980, se describieron más de 50 casos de contagio por accidente, ya sea en el laboratorio, en la captura del vector en área endémica, o en trabajos experimentales con cultivos o animales infectados (74).

Se cree, que puedan ser muchos más los casos de contagio por esta vía, y que no se hayan publicado por desconocimiento, o por posible riesgo de aprensión hacia el investigador o el laboratorio en cuestión (71). Los riesgos que dan lugar a una mayor proporción de infecciones por esta vía, se suelen deber al desconocimiento del personal, a la falta de seguridad en el equipamiento o instalaciones y, sobre todo, a la escasa protección empleada sobre uno mismo (71).

Mucho menos frecuente es la infección a través de la ingesta de leche materna contaminada, o los hombres que han tenido contacto sexual con mujeres infectadas durante su período menstrual (45,71). Realmente, estos casos de transmisión son excepcionales, por lo que sólo se desaconseja la lactancia materna si existe infección en fase aguda, niveles elevados de parasitemia, o presencia de mastitis (71).

1.7 FORMAS CLÍNICAS

En la enfermedad de Chagas se diferencian dos fases: aguda y crónica. Los periodos de incubación van a ser diferentes según el modo de infección, oscilando entre 3 y 112 días. En el caso de una infección por transmisión vectorial, el tiempo de incubación varía entre 4 y 15 días, en la infección por transmisión oral habitualmente es de 3 a 22 días, y en torno a 30-112 días en la infección por transfusión de sangre (19).

1.7.1 Fase aguda

Esta fase presenta una duración de 4-8 semanas. Puede cursar con un cuadro clínico consistente en fiebre, malestar general, debilidad, adenopatías generalizadas, edema subcutáneo localizado o generalizado, cefalea, mialgias y/o hepatoesplenomegalia (35). Sin embargo, sólo 1 de cada 30 personas infectadas por vía vectorial presentan síntomas, de tal forma que, en la mayoría de los pacientes, esta enfermedad cursa asintomática en la fase aguda (19).

En esta fase los pacientes pueden presentar el característico signo de Romaña: edema palpebral unilateral e indoloro, en caso de que la penetración del tripomastigote se haya producido a través de la conjuntiva; o un chagoma: edema y nódulo inflamatorio con zona central necrótica, duro, eritematoso e indoloro, que nos indicaría la puerta de entrada del parásito a través de la piel. Tanto el signo de Romaña como el chagoma, suelen desaparecer progresivamente a lo largo de las semanas (75)(19).

Durante la fase aguda es menos frecuente observar alteraciones cardíacas o neurológicas. Sólo el 5-10% de los casos presentan algún cuadro de miocarditis grave, neumonitis o meningoencefalitis, siendo más frecuente observar estos episodios en recién nacidos, lactantes o personas mayores (19). La tasa de mortalidad ronda en torno al 5-10 % durante la fase aguda, en relación a la aparición de dicha afectación cardíaca o neurológica (76).

En pruebas de imagen, como la radiografía de tórax, se pueden objetivar diferentes grados de cardiomegalia sugestivos de derrame pericárdico, y en el electrocardiograma alteraciones como taquicardia sinusal, bloqueo auriculoventricular, voltajes disminuidos del complejo QRS y cambios en la onda T (35)(37).

El cuadro clínico de aquellos pacientes infectados por transmisión oral puede presentar pequeñas diferencias o sintomatología más frecuente como cefalea, artralgias, cuadro digestivo consistente en vómitos, dolor abdominal e ictericia asociada a hepatitis, y la ausencia de chagoma, que nos indicaría la puerta de entrada del parásito. Por el contrario, podría describirse la presencia de hemorragia digestiva en relación al paso de dicho parásito a través de la mucosa. También, es más frecuente en casos de infección por transmisión oral, la aparición de un exantema maculopapular o petequial, eritema nodoso o manifestaciones cardíacas como derrame pericárdico o derrame pleural (19).

En el caso de los recién nacidos infectados congénitamente, se puede observar hipotonicidad, hepatoesplenomegalia, anemia y fiebre, así como prematuridad, bajo índice de Apgar o bajo peso al nacer. Estos síntomas aparecen tanto al nacer, como unas semanas después del parto. Otras alteraciones que se pueden objetivar durante el embarazo son las infecciones intrauterinas pudiendo dar lugar a abortos (77).

La tendencia de aquellas manifestaciones clínicas que suceden durante la fase aguda es a desaparecer de forma espontánea en la mayoría de los casos. Por tanto, estos pacientes

permanecerán en la fase latente/indeterminada, y sólo un 30-40% evolucionarán a la fase sintomática o crónica (76).

Patogenia de la fase aguda

Durante la infección aguda por *T. cruzi*, el daño producido en órganos y tejidos se debe principalmente a la acción directa del propio parásito y a la respuesta inmunoinflamatoria que se produce en el huésped (35)(78). Varios estudios experimentales han sugerido que la respuesta inmunitaria por células T CD4 y CD8, junto con la producción de citoquinas proinflamatorias específicas (factor de necrosis tumoral α , interleucina e interferón γ), son importantes en el control de la parasitemia en esta fase (35)(79)(80). Además, se ha descrito el papel protector de las células T *helper* (Th) frente al parásito a través de la síntesis de óxido nítrico (80)(81).

1.7.2 Fase crónica

Esta fase abarca dos periodos diferentes: uno durante el que el paciente se mantiene asintomático y no se objetiva afectación orgánica, llamado **forma latente o indeterminada**; y el segundo periodo, en el que existe alguna afección establecida cardiaca, digestiva o de ambos aparatos (35).

En el 60-70% de los casos, los pacientes se mantienen en la fase indeterminada, caracterizada por la ausencia de síntomas o signos que indiquen organicidad, pudiendo prolongarse dicho periodo a lo largo de toda la vida. Esto determina que aquellos pacientes que se mantengan en la fase indeterminada presentarán mejor pronóstico que el resto de los pacientes infectados. Sólo el 30-40% presentarán miocardiopatía o alteraciones digestivas debidas a esta enfermedad (35)(19). La falta de marcadores de progresión que indiquen una posible evolución a fases con afectación orgánica es uno de los grandes problemas a los que se enfrentan los profesionales clínicos durante esta fase.

El segundo periodo de la fase crónica se caracteriza por la presencia de alguna alteración patológica, bien cardiaca, bien digestiva o ambas a la vez (82)(83). Estas manifestaciones clínicas suelen aparecer entre 10 y 30 años después de haber adquirido la infección, con diferentes grados de gravedad (76) (55). En torno a un tercio de los pacientes infectados

que se mantiene en dicha fase con afectación orgánica, fallecerán a causa de esta enfermedad (84).

Patogenia de la fase crónica

Con respecto a la fase crónica, existen múltiples incógnitas sobre su patogenia y, a día de hoy, se cree que la persistencia del parásito (Figura 10) y la inflamación que esto genera es determinante y necesaria para el desarrollo y progresión de la enfermedad (85). Otros factores que potencialmente pueden contribuir al establecimiento de la enfermedad serían la virulencia de la cepa de *T. cruzi*, la vía de infección, el tropismo tisular, los propios mecanismo de defensa del huésped y su genética (86)(87)(84)(88).

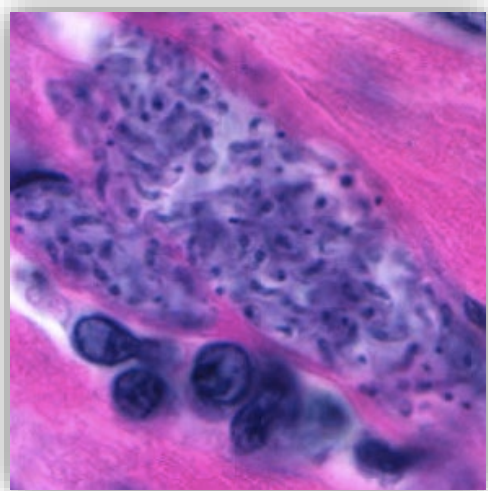


Figura 10: *Trypanosoma cruzi*. Amastigotes en tejido cardíaco. La sección se tiñe con hematoxilina-eosina (33).

Concretamente, el papel de la autoinmunidad es de un especial interés en la afectación cardíaca durante la fase crónica, como ya hemos descrito previamente. Las células musculares (principalmente cardíacas, lisas y esqueléticas) y las células ganglionares, son las elegidas por el parásito para la fase de multiplicación intracelular. Hasta estas células llegan los tripomastigotes, previamente expulsados de la vacuola y el citoplasma intracelular, para salir al torrente sanguíneo e infectar nuevamente más células (89). La presencia de miocarditis lentamente progresiva conducirá al deterioro de la función contráctil y, eventualmente, a la dilatación de las cuatro cámaras cardíacas. Además, a lo

largo del tiempo, se pueden llegar a desarrollar aneurismas apicales ventriculares y alteraciones segmentarias similares a las que se objetivan en enfermedades coronarias (80). De hecho, si se realiza un examen histológico exhaustivo, se observará fibrosis, edema, infiltración de células mononucleares y cicatrización del sistema de conducción, justificando la aparición de alteraciones como la disfunción del nodo sinusal, bloqueo auriculoventricular, bloqueo sinusal o bloqueo intraventricular. Por otro lado, la destrucción de las fibras cardíacas y la fibrosis generarán eventos de insuficiencia cardíaca y arritmias (89).

Estudios experimentales realizados en modelos animales y hallazgos de necropsias de pacientes infectados con *T. cruzi*, muestran que la razón principal de la miocardiopatía se debe a un proceso inflamatorio (Figura 11), más destacado en la fase aguda, pero que se mantiene de forma constante a lo largo del tiempo y durante la fase crónica. En estos estudios en concreto, se demostraron anomalías degenerativas en las células de Schwann y fibras nerviosas, explicando los hallazgos compatibles con el daño ganglionar y la reducción neuronal a nivel intramural del subepicardio. En los modelos de ratones existe una correlación entre la prevalencia de miocarditis y la gravedad de la insuficiencia cardíaca, además de una asociación entre la dilatación ventricular con la inflamación y la fibrosis (90).

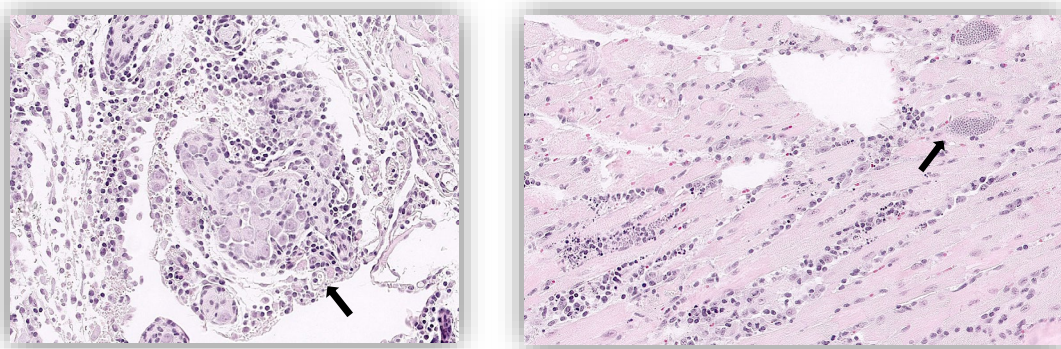


Figura 11, izquierda: Ganglio nervioso en epicardio con infiltración inflamatoria. Figura 11, derecha: Quistes de amastigotes con miocarditis asociada.

Con respecto al aparato digestivo, no está claro por qué algunos pacientes desarrollan formas cardíacas, otros formas digestivas y otros una forma combinada. Esto se cree que puede estar en relación al tipo de tripanosoma involucrado.

Las alteraciones que se observan en esófago y colon se deben a la denervación de la compleja red de neuronas intramurales del sistema gastrointestinal, dando lugar a la pérdida estructural del tejido con dilataciones y aparición de megasíndromes (91). Es fundamental la participación del sistema nervioso entérico en la patogénesis digestiva. En este caso, se ha descrito una clara degeneración y disminución del número de neuronas intrínsecas, además de un déficit de las células intersticiales de Cajal, daño de las células ganglionares y aumento de fibrosis y recuento de mastocitos (92). La destrucción de las neuronas intramurales se confirmó mediante recuentos neuronales meticulosos realizados en diferentes partes del sistema digestivo (93).

La patogénesis de los pacientes con afectación digestiva sigue sin entenderse completamente, y durante la fase aguda se cree que una neurotoxina liberada por el parásito, es un determinante de la lesión neural. La respuesta celular y humoral específica frente a *T. cruzi* desarrollada por el huésped, es relevante frente al proceso inflamatorio crónico, pero no la causa única y principal de los daños producidos por la enfermedad de Chagas. Es evidente que existe una correlación entre la persistencia del parásito y la presencia de enfermedad en el tejido muscular tras realizar estudios de PCR en modelos murinos (93).

AFECTACIÓN CARDIACA:

La evolución de la miocardiopatía chagásica es en la actualidad muy difícil de predecir, y los hallazgos observados en pacientes infectados por *T. cruzi* con miocardiopatía son muy variables a lo largo de toda la enfermedad. Como ya dijimos en el apartado de patogenia, las anomalías en el sistema de conducción, miocarditis, trastornos microvasculares, aneurismas apicales o alteraciones de la contractilidad, son consecuencia de la infiltración inflamatoria, fibrosis intersticial y muerte celular en esta localización (90).

La afectación cardíaca es la manifestación más frecuente y grave de esta enfermedad, desarrollándose en torno al 20-30% de los pacientes (35)(94)(95). En algunos estudios recientes se observa una ligera tendencia a aumentar el número de pacientes que presentan dicha afección (96)(97). Principalmente, se observan alteraciones relacionadas con el trastorno de conducción y el miocardio, y los hallazgos más comunes en una fase precoz son: bloqueo fascicular anterior izquierdo, bloqueo de rama derecha y anomalías del movimiento de la pared ventricular (12).

Las manifestaciones en etapas más tardías de la enfermedad incluyen la disfunción del nodo sinusal (pudiendo generar bradicardia extrema), bloqueos auriculoventriculares de alto grado, taquicardia ventricular sostenida o no sostenida, miocardiopatía dilatada, aneurismas apicales (más frecuentes en ventrículo izquierdo) y aparición de embolias (12,82).

Concretamente, en el **electrocardiograma** (ECG), las alteraciones mayormente objetivadas son: bloqueo de rama derecha, bloqueo fascicular anterior izquierdo, extrasístoles ventriculares, cambios en el intervalo ST y ondas T, aparición de ondas Q patológicas y bajos voltajes en el complejo QRS (82)(83). Pero va a ser la combinación de BRD y HAI (Figura 12) el hallazgo más típico visto en el ECG en pacientes con enfermedad de Chagas (98).

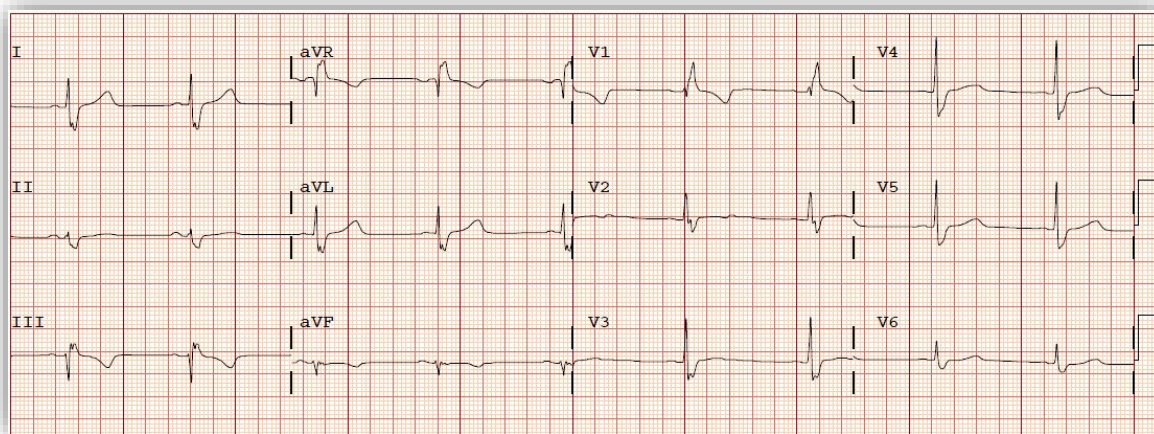


Figura 12: ECG de un paciente del estudio con bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior izquierdo.

En pruebas como el **Holter**, la presencia de extrasístoles ventriculares o taquicardia ventricular no sostenida, es común si hablamos de pacientes con enfermedad de Chagas. Estos hallazgos están correlacionados con el grado de gravedad de la disfunción ventricular, aunque no es exclusivo, ya que pueden observarse también en casos que preservan la función ventricular.

El 40% de los pacientes que tienen alguna alteración en la movilidad de la pared presentan además taquicardia ventricular no sostenida, y en el 100% de los casos con insuficiencia cardíaca (82)(99).

La presencia de arritmias, como la taquicardia ventricular sostenida, también es característica de esta enfermedad, debido a la aparición de un circuito de reentrada intramiocárdico o subepicárdico, localizado mayoritariamente en la pared inferolateral posterior del ventrículo izquierdo (100)(101). La presentación clínica más típica de estas arritmias son la sensación de palpitaciones, el mareo o el síncope (102) (103,104).

La aparición de embolias sistémicas o pulmonares se produce con relativa frecuencia y es debida a la formación de trombos murales en las cavidades cardíacas (105). Estos trombos se generan a consecuencia de la dilatación ventricular o la presencia de aneurismas de la pared miocárdica (Figura 13). En muchos casos se diagnostican tras la aparición de eventos cerebrovasculares, pero aquellos localizados en pulmones, riñones y bazo se reconocen, en un alto porcentaje, durante el procedimiento de necropsia. Debido a esto, la propia enfermedad de Chagas se considera, por sí sola, factor de riesgo para la aparición de eventos cerebrovasculares (106). A raíz de estudiar los eventos descritos se ha denominado a esta miocardiopatía como "embolígena", y se cree que la obstrucción provocada por la embolia de una arteria coronaria, puede ser la causa más probable del infarto agudo de miocardio en los pacientes jóvenes con enfermedad de Chagas (55).

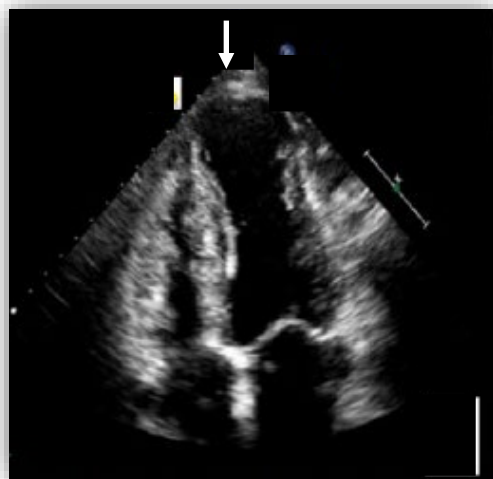


Figura 13: Imagen ecocardiográfica mostrando aneurisma apical en ventrículo izquierdo. Fuente: (76).

La presencia de signos o síntomas sugerentes de insuficiencia cardíaca, nos indica ya un estadio avanzado, tratándose en la mayoría de los casos de una manifestación tardía. Generalmente afecta a ambos ventrículos, aunque habitualmente existe un ligero

predominio de la insuficiencia cardíaca derecha con la aparición de síntomas como hepatomegalia congestiva, ingurgitación yugular, ascitis o edema en miembros inferiores (82)(83). La alteración más común observada en cuadros de insuficiencia cardíaca terminal es la miocardiopatía dilatada, siendo la causa más frecuente de muerte en dichos pacientes (67). La presencia de insuficiencia cardíaca se asocia a una mortalidad mayor que la producida por otras causas (107).

Rassi, et al. (2010), sugiere una clasificación para la enfermedad de Chagas con el objetivo de ayudar al profesional a diferenciar las distintas formas de la enfermedad y mejorar la toma de decisiones. Por ello, estudia la capacidad funcional y los hallazgos obtenidos del ECG, Holter, ecocardiograma de los pacientes (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación funcional de la enfermedad de Chagas en fase crónica según Rassi et al. Fuente: (37).

	Síntomas cardiacos*	NYHA	Cambios ECG	Rx tórax: cardiomegalia	Holter 24h (arritmia ventricular**)	ECO: Alteración movilidad pared VI	ECO: Aneurisma apical VI	TE	TVS	Muerte súbita
Indeterminado	Ausente	..	Ausente	Ausente	Muy raro	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Forma digestiva***	Ausente	..	Ausente	Ausente	Raro	Raro	Muy raro	Ausente	Ausente	Ausente
Estadio cardíaco I	Ausente o mínimo	..	No especifica \$	Ausente	Raro	Raro	Muy raro	Muy raro	Raro	Raro
Estadio cardíaco II	Bastante común	I o II	BRD con o sin HAI, EV, cambios difusos en ST y T, BAV primer o segundo grado	Ausente o leve	Común	Ausente o segmentaria	Común	Bastan te común	Común	Común
Estadio cardíaco III	Común	I, II o III	Estadio anterior más ondas Q, ondas ventriculares polimorfás, BAV avanzado, bradicardia severa, voltaje QRS disminuido	Leve a moderado	Muy común	Segmentaria o difusa (leve a moderada)	Común	Bastan te común	Común	Común
Estadio cardíaco IV	Común	II, III o IV	Estadio anterior más fluter o FA	Moderado a grave	Muy común	Difusa (severa)	Bastante común	Común	Bastante común	Bastante común

NYHA: New York Heart Association. ECG: Electrocardiograma. TVS: Taquicardia ventricular sostenida. TE: Tromboembolismo. EV: Extrasístoles ventriculares. BAV: Bloqueo auriculoventricular. ..= datos no aplicables. *Palpitaciones, presíncope, síncope, dolor torácico atípico, fatiga y edemas. **Parejas o episodios no sostenidos de taquicardia ventricular, o ambos ***Megaeosofago o megacolon, o ambos sin aparente afectación cardíaca; la forma cardiodigestiva de la enfermedad crónica de Chagas no está incluida en la tabla porque son posibles varias combinaciones. \$: Bloqueo incompleto de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo, bradicardia leve, aumento leve de intervalo PR, cambios leves en segmento ST.

Según estudios publicados recientemente, las alteraciones que implican peor pronóstico durante la fase crónica son: disfunción ventricular izquierda, presencia de cardiomegalia (Figura 14), taquicardia ventricular no sostenida y clase funcional III o IV de la New York Heart Association (NYHA) (12,108).



Figura 14: Radiografía de tórax con cardiomegalia en paciente con miocardiopatía dilatada por enfermedad de Chagas (109).

Una de las principales causas de muerte en pacientes con miocardiopatía chagásica es la muerte súbita, afectando a dos de cada tres pacientes, junto con la insuficiencia cardíaca refractaria (25-30%) y el tromboembolismo (10-15%) (110). El riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad más avanzada (NYHA clase III o IV, disfunción del ventrículo izquierdo, cardiomegalia o arritmias ventriculares), alcanza el 85% a los 10 años (12).

En estos casos, en los que se objetiva miocardiopatía grave, las opciones para evitar un desenlace fatal son la implantación de un desfibrilador automático implantable (DAI) o el trasplante cardíaco (111).

AFECTACIÓN DIGESTIVA

Las manifestaciones gastrointestinales son menos frecuentes que las cardíacas en pacientes con enfermedad de Chagas, y resultan de la inflamación crónica y la destrucción de las neuronas parasimpáticas, lo que conduce a una distensión progresiva del esófago o del colon rectosigmoide (112). La disfunción gastrointestinal es responsable del desarrollo de megasíndromes, principalmente en esófago, colon o ambos (113)(35).

En torno a un 10-20% de los pacientes presentan alguna alteración gastrointestinal, con un mayor predominio en aquellos que proceden del sur de Sudamérica (Argentina, Brasil, Chile y Bolivia). Esta distribución probablemente se deba a las diferencias existentes entre las múltiples cepas del parásito (95)(114)(115)(116).

Las alteraciones objetivadas en el esófago pueden ser muy variables, y entre ellas se incluyen anomalías en la movilidad, con disminución del peristaltismo a diferentes escalas (incluso en pacientes que no perciben ningún síntoma) (Figura 15), déficit de relajación del esfínter inferior y dilatación progresiva, pudiendo progresar a megaesófago y suponiendo por tanto un mayor riesgo de complicaciones (117).

Los síntomas que refieren los pacientes de forma habitual con estos hallazgos son: pirosis, epigastralgia, odinofagia, disfagia, reflujo gastroesofágico, pérdida de peso, hipo, sialorrea, aspiración bronquial, dolor torácico, tos, vómitos y desnutrición (12)(118)(119). Estos síntomas, habitualmente, progresan lentamente y se exacerban con la ingestión de alimentos, siendo el principal síntoma la disfagia (120).

A día de hoy, la presencia de megaesófago está asociada a un aumento de cáncer de esófago (121). Esto apoya, por tanto, que los pacientes que presenten sintomatología tendrán indicación de solicitar un estudio completo con endoscopia digestiva alta (12).



Figura 15: Tránsito esofagogastroduodenal en un paciente de nuestro estudio con acalasia.

El megacolon afecta mayoritariamente el sigma, recto y colon descendente, siendo mucho más raro observarlo en las partes proximales del colon o intestino delgado. Los síntomas

asociados a la presencia de megacolon son principalmente: estreñimiento, meteorismo, distensión y dolor abdominal, timpanismo, disquecia o fecaloma, obstrucción intestinal, isquemia intestinal y vólvulo sigmoideo (119)(120)(122)(114). A diferencia del síndrome megaesofágico, en los pacientes con megacolon no existe una asociación demostrada con el cáncer colorrectal (123).

Existen, por otro lado, manifestaciones en la vesícula y la vía biliar, principalmente asociadas a un aumento en la incidencia de colelitiasis (124)(125) y a la presencia de un ensanchamiento del colédoco y la vesícula tras la pérdida del número de neuronas en esta localización (126). En torno a un 8,4% de los pacientes con megacolon presentan litiasis biliar (127).

Por último, los pacientes que presentan la forma cardiodigestiva de la enfermedad de Chagas, es decir afectación cardíaca y digestiva combinadas, son diagnosticados en menor proporción. Alrededor de un 5-20% presentan hallazgos digestivos tras haber tenido un diagnóstico previo de miocardiopatía. En la actualidad, existen muy pocos estudios en relación a esta forma combinada, y hasta ahora se cree que son las alteraciones esofágicas las que preceden al resto de los hallazgos (12,35).

AFECTACIÓN NEUROLÓGICA:

La enfermedad de Chagas se considera también una causa importante de accidentes cerebrovasculares de origen cardioembólico, siendo dos veces más frecuente en aquellos pacientes que presentan miocardiopatía de origen chagásico (12)(128). Debido a la aparición de aneurismas, dilatación miocárdica o arritmias, existirá una mayor predisposición a la formación de émbolos cardíacos, que pueden desplazarse hacia la circulación pulmonar, o en este caso a la circulación sistémica, produciendo eventos isquémicos cerebrales mucho más evidentes (55). Por otro lado, parece existir una asociación entre estos eventos isquémicos con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y el volumen de la aurícula izquierda, de forma independiente (128).

En torno a un tercio de pacientes que presentan un accidente cerebrovascular isquémico pueden tener infección por *T. cruzi* en fase indeterminada, es decir, pacientes que se mantienen asintomáticos y sin organicidad durante dicho periodo (129), siendo en muchos casos la primera manifestación de la enfermedad. Existen pocos estudios al respecto, aun así la incidencia se estima en 2,7 casos por cada 100 pacientes/año (128).

La meningoencefalitis se informa sobre el 5-10% de los casos, siendo más habitual entre los recién nacidos, lactantes y ancianos (19).

La presencia de polineuropatía sensorial afecta a un 10% de los pacientes con grado leve, sin necesidad de que exista afectación orgánica en otra localización (130). Esta polineuropatía se demuestra mediante técnicas electrofisiológicas, caracterizándose por la presencia de un reducido número de unidades motoras funcionales en los músculos tenar, hipotenar y soleo, velocidades enlentecidas en la conducción nerviosa sensorial y motora y baja amplitud en el potencial de acción sensorial (130).

1.7.3 Reactivación e inmunosupresión

Existe un porcentaje de pacientes que durante el transcurso de la enfermedad de Chagas pueden presentar una alteración en su sistema inmunológico, dando lugar a una posible reactivación de la infección, con la consecuente aparición de síntomas asociados a dicha enfermedad (120)(131)(132).

Como ya dijimos en el apartado de patogenia, las personas con inmunosupresión (por ejemplo, SIDA, receptores de transplantes de órganos o enfermos de neoplasias hematológicas) presentarán un estado de mayor parasitemia y replicación intracelular del parásito, por lo que la aparición de síntomas y signos será más frecuente en estos pacientes. Es común ver que los síntomas que se desarrollan en esta fase son similares a los que se producen durante la fase aguda, siendo los más importantes y frecuentes la paniculitis, miocarditis y meningoencefalitis con una elevada parasitemia en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (132), aunque también están descritas algunas formas atípicas como la afectación cerebral con la presencia de un pseudotumor o chagoma (133).

Según el nivel de inmunosupresión o la enfermedad de base, el riesgo y el porcentaje de reactivación variará. Se estima en torno al 20-50% en los pacientes transplantados de corazón (134), el 8-37% en transplantados renales, un 19% en transplantados de hígado (135) y el 27% en transplantados de médula ósea (136)(137).

Otros pacientes con riesgo y que deberán ser supervisados, son aquellos que están sometidos a tratamientos inmunosupresores, como micofenolato mofetilo, azatioprina y ciclosporina (138).

En los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) o SIDA, la enfermedad de Chagas se considera una infección oportunista y la probabilidad de presentar un cuadro de reactivación se asociará con la falta de adherencia al tratamiento antirretroviral, un bajo recuento de CD4, o la presencia de otras infecciones oportunistas asociadas (139). Como ya hemos mencionado, en estos pacientes es más frecuente la aparición de cuadros neurológicos tipo meningoencefalitis debido al estado de inmunosupresión que presentan, pudiendo confundirse con otras patologías como la toxoplasmosis o el linfoma cerebral primario (140,141). La miocarditis, es la segunda manifestación más común de reactivación, ocurriendo en el 25% de los pacientes con infección por VIH y *T. cruzi* (141). Más raro es la afectación de otros órganos como piel, pericardio, peritoneo o el tracto gastrointestinal. Estos pacientes que padecen la coinfección por VIH y *T. cruzi*, no sólo se diagnostican en zonas endémicas, sino también en zonas como América del Norte y Europa (140).

1.8 DIAGNÓSTICO

La fase aguda se caracteriza por una elevada parasitemia en sangre que se mantiene alta durante las primeras cuatro semanas disminuyendo paulatinamente en las siguientes ocho (19). Por esta razón, el método utilizado en dicha fase se basa en la detección de tripomastigotes en sangre periférica (35), ya sea en un examen en fresco, en una extensión o gota gruesa teñida con Giemsa o después de realizar la prueba de Strout.

A medida que pasan las semanas y entramos en la fase crónica, la carga parasitaria en sangre descende y la detección directa del parásito se hace más difícil (35). Durante esta fase, ya que existe una elevada producción de anticuerpos específicos tipo IgG (inmunoglobulinas G) fácilmente detectables durante mucho tiempo, se emplean las pruebas serológicas (142), y en la mayoría de los pacientes se mantendrán positivas a lo largo de toda la vida (76). Para asegurar un diagnóstico, dado que no existe ningún método que alcance el 100% de sensibilidad y especificidad, se requiere el uso, al menos, de dos métodos serológicos diferentes (143).

A continuación, explicamos de forma individualizada los diferentes métodos diagnósticos.

1.8.1 Métodos parasitológicos

Examen en fresco

Técnica sencilla y muy útil en la fase aguda. Consiste en la observación mediante microscopia directa de sangre periférica, entre portaobjetos y cubreobjetos. Permite distinguir fácilmente la presencia de los tripomastigotes debido a sus rápidos movimientos entre las células sanguíneas. Dentro de los primeros 30 días de inicio de los síntomas presenta una sensibilidad del 85%, esta puede aumentar a más del 95% al aplicar técnicas de concentración, por ejemplo microhematocrito o el método Strout (144) (145).

Gota gruesa

Consiste en poner 2 o 3 gotas de sangre en un portaobjetos y con la esquina de otro se unen en movimientos rápidos, extendiéndose en una capa gruesa y uniforme. Posteriormente se deja secar, se introduce la lámina en agua destilada y se tiñe con Giemsa para permitir la visualización de la morfología del propio parásito (146).

Este es uno de los métodos diagnósticos más frecuentemente utilizados en los estudios epidemiológicos de campo debido al bajo coste que supone su realización y a la facilidad para visualizar el parásito (142).

Extensión de sangre periférica

Para ello se coloca una pequeña cantidad de sangre sobre un portaobjetos y con otra lámina, en un ángulo de 45°, se extiende la gota a lo largo de la superficie (Figura 16). Después se deja secar, se fija y se tiñe igual que con la técnica de la gota gruesa (147).

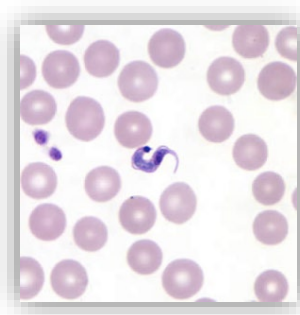


Figura 16: *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigote en un frotis de sangre teñido con Giemsa (33).

Técnicas de concentración

Estas técnicas permiten aumentar la sensibilidad de la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre, ya sea en un examen en fresco, en una extensión o en gota gruesa teñida con Giemsa.

Una de las formas para llevar a cabo esta técnica es el método Strout, que consiste en la concentración de los parásitos a partir de la extracción de 3 ml de sangre y su incubación a 37°C durante 1 hora, permitiendo la suspensión de los tripomastigotes en el sobrenadante. Una vez centrifugado se analiza el sedimento.

Microhematocrito

Es la técnica de elección cuando existe sospecha de infección congénita. Es utilizado principalmente en recién nacidos como técnica de concentración en los primeros meses de vida. Una muestra de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica del recién nacido, se centrifuga y se observa al microscopio el movimiento de los parásitos en la interfase que se forma entre los hematíes y el plasma. Puede alcanzar una sensibilidad de hasta un 95% (148) (Figura 17).

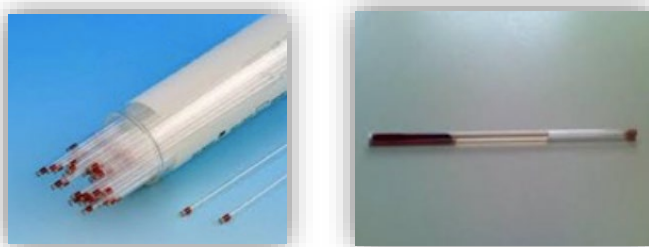


Figura 17: Tubo capilar de hematocrito. Fuente: (149).

Xenodiagnóstico

Es considerado un método indirecto de visualización, a diferencia de los explicados anteriormente. Inicialmente, se adquieren ninfas de triatominos exentos de infección y se depositan en la piel del antebrazo del paciente durante 30 minutos aproximadamente, para que así se alimenten de la sangre del sujeto. Después, se mantienen estos insectos en condiciones óptimas para su desarrollo y se procede a la observación de parásitos en el contenido intestinal del insecto en los días 30 y 60 tras el contacto con el paciente.

Esta prueba fue introducida por Brumpt en 1914 y descrita como xenodiagnóstico natural, posteriormente en 1940 Romaña y Gil comienzan a utilizar el xenodiagnóstico artificial, que impide el contacto directo del sujeto con el insecto (150).

Con este método es frecuente la aparición de reacciones alérgicas y cutáneas, que, en muchas ocasiones, requieren un tratamiento sintomático. La sensibilidad del xenodiagnóstico va a depender de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente y del grado de parasitemia. Por ello, en las fases agudas su sensibilidad será mucho mayor que en las fases crónicas, donde su positividad se estima en torno a un 30-50% (19)(141).

Hemocultivo

Se procede a la incubación de la sangre del paciente en un medio de cultivo concreto (triptosa de infusión hepática). Este cultivo se analiza hasta 180 días, y la observación de formas flageladas de *T. cruzi* determina el resultado positivo. Esta técnica requiere menos infraestructura que el xenodiagnóstico, pero a día de hoy tiene poca utilidad por su baja sensibilidad principalmente durante la fase crónica (147)(76).

Tanto el xenodiagnóstico como el hemocultivo, además de su interés diagnóstico, son herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones.

Métodos moleculares

En los últimos años, la detección del ADN mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) está cobrando gran interés en el ámbito de investigación, principalmente como herramienta diagnóstica y como marcador en la respuesta parasitológica al tratamiento. Esto supone un reto al tratarse de una enfermedad con niveles de parasitemia intermitentes y bajos durante la fase crónica, además de la diversidad de los genotipos que se distribuyen de manera desigual por las diferentes regiones endémicas (151).

Hasta el momento los métodos de PCR más empleados para el diagnóstico molecular de la infección por *T. cruzi*, son la PCR para la detección de ADN satélite (PCRsat) dirigida a la secuencia satélite del genoma, y la PCR para la detección del ADN del minicírculo del kinetoplasto (PCRk), en la que se amplifica un fragmento de 195 pb y de 330 pb, respectivamente (152). La PCR tiene una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *T. cruzi* cuando hablamos de la fase aguda o congénita de la infección,

pero esto cambia cuando se trata de la fase crónica descendiendo su sensibilidad diagnóstica (153).

Ramírez et al., (154) comparó el rendimiento de dos métodos de detección molecular, ADN satélite (PCRsat) y ADN de kinetoplasto (PCRk), en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, mostrando mayor sensibilidad la PCRk al detectar la infección en un mayor número de muestras.

La PCR anidada conocida como Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Esta técnica proporciona una mayor sensibilidad que el ensayo de PCR de una sola ejecución y ya se ha informado como útil en el diagnóstico suplementario de la enfermedad de Chagas (155).

La variabilidad de los resultados entre las pruebas para la detección de ADN pueden ser debidos al volumen de la muestra recogida, los procedimientos de conservación, las condiciones de aislamiento de ADN, las secuencias dianas del parásito, los cebadores o reactivos, etc...(156). Esto apoya la necesidad de protocolos estandarización de PCR para la detección del parásito en sangre.

Como ya hemos comentado, la PCR, en comparación con otros métodos parasitológicos tradicionales, ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad (100%) (54,153) otorgándole mayor utilidad en los casos de serodiscordancia o a la hora de identificar posible fracaso terapéutico.

Según el comité asesor de la OMS se aconseja realizar PCR en la fase aguda, congénita o durante el seguimiento tras el tratamiento. También está contemplado en los casos donde se sospecha una reactivación (157). A pesar de ello, este método no es útil para valorar el éxito del tratamiento ya que su negatividad no indica curación parasitológica (119). Una PCR positiva confirma la enfermedad, pero un resultado negativo no la descarta, teniendo que realizar por tanto dos técnicas serológicas diferentes (158–160).

1.8.2 Métodos serológicos

Estos métodos se basan en la determinación de inmunoglobulinas IgG anti *T. cruzi*. Existen técnicas denominadas convencionales y otras no convencionales. En el caso de

las técnicas convencionales se emplea todo el parásito como antígeno, siendo estos los más empleados: inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemoaglutinación indirecta (HAI) o ELISA. En el caso de las técnicas no convencionales se usan antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos (76).

ELISA

Técnica basada en ensayos inmunoenzimáticos. En este método los antígenos específicos de *T. cruzi* se adhieren a los diferentes pocillos de una placa de plástico. Esta placa es incubada con la sangre de los pacientes a estudio, produciendo un cambio de coloración mediante una reacción enzimática. La lectura de estos resultados se obtiene a través de la medición de densidad óptica con un equipo especializado (161)(162). Estudios apuntan una alta sensibilidad y especificidad en esta técnica (37).

Inmunofluorescencia

Es una de las técnicas más sensibles, y se divide en directa e indirecta, siendo ésta última la más utilizada para la detección de la infección por *T. cruzi*. Este procedimiento se basa en emplear anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente que detectan antígenos específicos, para posteriormente poder identificarse mediante luz ultravioleta. La sensibilidad de esta prueba varía en torno al 93-100% (147) y la especificidad ronda el 99,7%, pudiendo en algunos casos existir falsos positivos por reacciones cruzadas con otros parásitos como la *Leishmania* spp. o *T. rangeli*. (19) (Figura 18).

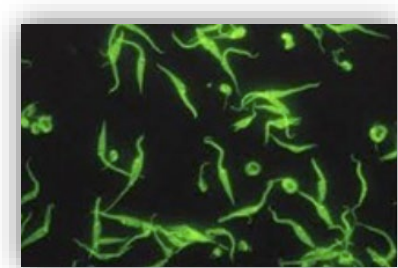


Figura 18: Estructura molecular del fármaco benznidazol. Fuente: (149).

Hemaglutinación indirecta (HAI)

Esta técnica utiliza eritrocitos de ave sensibilizados con antígenos de *T. cruzi*. La aglutinación se observa cuando estos antígenos reaccionan con anticuerpos presentes en el suero del paciente con infección (163).

CASOS ESPECIALES

Infección congénita

Se recomiendan métodos parasitológicos directos, ya sea mediante PCR o el examen microscópico de la interfase formada en la técnica de concentración del microhematocrito, en los primeros meses de vida (112). En caso de no poder realizar estas pruebas o presentar resultados negativos en repetidas ocasiones, se podrá confirmar la infección con pruebas serológicas, que deberán ser solicitadas a partir del sexto o noveno mes de vida, es decir en el momento en el que los anticuerpos maternos ya no están presentes en la sangre del bebé. (76)(158)(160)(164)(165).

Sospecha de reactivación

El diagnóstico se confirma a partir de métodos parasitológicos directos, pudiendo hallar el parásito en forma de tripomastigote en sangre o fluidos corporales, o amastigotes en muestras de tejido. La técnica mediante PCR en muchos casos no sería útil para el diagnóstico de la reactivación (35)(12).

Donantes de sangre y/o órganos

Desde septiembre de 2005, el Real Decreto 1088/2005 (166) establece la necesidad de llevar a cabo un cribado universal a todos los donantes con posible riesgo de infección. Estos pacientes se consideran aquellos que proceden de zona endémica o son nacidos de madres nativas de dichas áreas, aquellos que han recibido transfusiones o hayan vivido largos periodos de tiempo en estos países. Este cribado se realiza mediante técnicas serológicas altamente sensibles, como el ELISA (76,167).

1.9 TRATAMIENTO

En los últimos 50 años se han utilizado, como tratamiento específico para la enfermedad, dos fármacos denominados nifurtimox (NX) y benznidazol (BZ); con el objetivo de erradicar el parásito y evitar así la progresión de la enfermedad (120)(168). Se ponen a

disposición del mercado a partir de la década de los 60, siendo ambos el pilar del tratamiento parasiticida y los únicos autorizados para la enfermedad de Chagas (45)(12)(169). Estos fármacos actúan formando radicales libres y/o metabolitos electrofilicos. Uno de los principales problemas que surgen en esta enfermedad es su dudosa efectividad, que parece disminuir a medida que pasa el tiempo y la enfermedad progresa a una fase crónica. Por lo tanto, un diagnóstico precoz que permita adelantar el tratamiento puede evitar complicaciones inmediatas durante la fase aguda, o la progresión hacia el daño cardíaco y digestivo durante la fase indeterminada/crónica (45)(12)(170)(171)(172).

Por otro lado, uno de los mayores inconvenientes de estos tratamientos, es la elevada tasa de efectos secundarios que producen, y el abandono de estos por su mala tolerancia (45)(84).

1.9.1 Indicaciones terapéuticas

El tratamiento tripanocida estaría indicado actualmente en los siguientes casos según las últimas recomendaciones (173):

Siempre se debería tratar:

- Infección aguda: Independientemente de la forma de contagio, el tratamiento se iniciaría lo antes posible. El porcentaje de cura durante esta fase es alto (en torno el 80% de los casos) (174).
- Infección congénita: El tratamiento presenta una eficacia del 100% si se administra durante el primer año de vida (46).
- Infección crónica en menores de 18 años.
- Reactivación de la infección por VIH/SIDA o inmunosupresión: El pronóstico es más favorable cuanto antes se comience el tratamiento (175)(176). Se tratarían durante 60 días consecutivos, pudiéndose prolongar hasta 90 días dependiendo de las condiciones clínicas del paciente (177).

Generalmente se debería ofrecer tratamiento:

- Infección crónica en pacientes con edad comprendida entre los 19 y los 50 años, en fase latente o indeterminada, y sin afectación cardíaca grave.

Casos especiales: Recomendar siempre el tratamiento en aquellos que presenten un recuento de CD4 menor de 200 células por μL , o independientemente de estas cifras si van a recibir tratamiento inmunosupresor. En pacientes transplantados se necesita una monitorización de la parasitemia posterior al procedimiento para excluir una posible infección derivada del donante (donante seropositivo y receptor seronegativo) o reactivación (receptor seropositivo). Además, se aconseja tratar al receptor previamente si el transplante es de corazón, o si el donante presenta infección por *T. cruzi* (12).

Opcional:

- Infección crónica en pacientes con más de 50 años sin cardiopatía grave: Esta indicación debe ser opcional e individualizada según el paciente y sus comorbilidades (12).
- Infección crónica con enfermedad gastrointestinal.

No es aconsejable tratar:

- Infección crónica con cardiopatía grave/fracaso cardiaco establecido: A día de hoy, existe controversia a la hora de tratar a los pacientes que se encuentren en esta situación por el déficit de estudios que evidencien la eficacia del benznidazol. Recientemente en un ensayo prospectivo, multicéntrico y aleatorizado con 2854 pacientes (Estudio BENEFIT) (178), se demostró, una vez más, el dudoso beneficio del benznidazol en comparación con placebo en aquellos pacientes que eran diagnosticados de esta enfermedad en fase crónica, además de no impedir la progresión de la afectación cardiaca a pesar de ser tratado (173)(158). Durante esta fase el porcentaje de cura ronda únicamente el 10 % (84)(179)(174)(180)(37)(173)(102)(178)(171)(119)(181).
- Megaesófago con afectación de la deglución.

Contraindicado su uso:

- Fracaso renal o hepático.
- Embarazo: Limitada experiencia del uso de benznidazol durante la gestación (12).

A los pacientes que presenten leve insuficiencia hepática, renal o enfermedades hematológicas, solo se les debería administrar el medicamento bajo estricta supervisión médica, en caso de que así se decida. Durante todo el tratamiento se vigilará al paciente con controles analíticos, atendiendo especialmente al hemograma, y se recomendará a los pacientes que se abstengan de beber alcohol así como protección frente al embarazo (182).

1.9.2 Dosis terapéuticas

Tabla 3: Dosis aconsejadas según los siguientes supuestos (12)(158)(37)(173)(183).

Dosis terapéuticas	
Infección aguda por transmisión vectorial u oral	BZ 5-10 mg/kg/24h durante 60 días o NX 10-15 mg/kg/24h durante 60-90 días Niños < 12 años: BZ 10 mg/kg al día durante 60 días o NX 15 mg/kg al día durante 60 días
Infección aguda congénita	BZ 10 mg/kg/24h durante 60 días, o NX 15-20 mg/kg/24h durante 60 días
Infección aguda por accidente de laboratorio	BZ 5-7,5 mg/kg/24h o NX 8-10 mg/kg/24h durante 10-14 días
Infección aguda posterior a una transfusión o transplante de donante infectado	BZ 5-7,5 mg/kg/24h o NX 8-10 mg/kg/24h durante 60 días
Infección crónica en niños y adultos	BZ 5-7,5 mg/kg/24h durante 60 días o NX 8-10 mg/kg/24h durante 60-90 días
Reactivación en pacientes VIH	Iniciar de forma precoz el tratamiento antirretroviral y BZ 5-7,5 mg/kg/24h o NX 8-10 mg/kg/24h durante 60 días. Si hay afectación del SNC: BZ 15 mg/kg/24h (37). En casos de profilaxis secundaria: BZ 5 mg/kg/24h tres veces por semana o 200 mg diarios hasta que las cifras de CD4>200-250 células por µL durante 6 meses y la carga viral se mantenga indetectable
Reactivación en receptores de transplantes	BZ 5-7,5 mg/kg/24h durante 60 días o NX 8-10 mg/kg/24h durante 90 días

Fracaso terapéutico
(generalmente cuando la PCR
continúa positiva):

Se puede probar con el mismo tratamiento o cambiar
a la segunda opción (BZ o NX) durante 60-90 días

BZ: benznidazol, NX: nifurtimox, mg: miligramo, kg: kilogramo, h: horas, SNC: sistema nervioso central, VIH: virus inmunodeficiencia humana, µL: microlitro.

1.9.3 Tratamientos específicos

BENZNIDAZOL

El benznidazol se comenzó a distribuir en la década de los 60. Es un 2-nitroimidazol [*N*-bencil-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il) acetamida] (Figura 19), comercializado por primera vez en el año 1972 por Roche con el nombre de Rochagan®. Este fármaco, junto con nifurtimox, mostró una alta actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *T. cruzi*. Inicialmente solo estaba indicado en la fase aguda, por lo que su producción era baja, y fue posteriormente cuando esto cambió al demostrar su eficacia en casos de infección crónica en niños (183)(158). A finales del siglo XX, la empresa Roche traspasó la producción del fármaco a LAFEPE (Laboratorio Farmacéutico de Pernambuco) (169). Durante años existió una escasez importante del producto debido al aumento de la demanda, y es en 2012 cuando anuncian el inicio de la producción de benznidazol por el laboratorio argentino ELEA y su distribución bajo el nombre Abarax® (169).

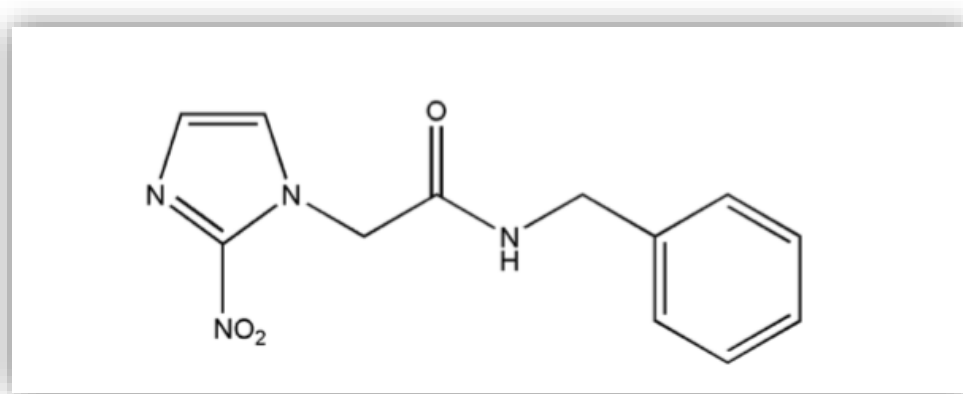


Figura 19: Estructura molecular del fármaco benznidazol. Fuente: Fonseca Berzal CR (2016) (184).

Su mecanismo de acción se caracteriza por intervenir a través de tres métodos: Acción tripanocida (formación de enlaces covalentes con macromoléculas de *T. cruzi*, tales como ADN y citocromo P450); aumento de la fagocitosis y la lisis del parásito a través de un mecanismo dependiente de IFN- γ ; y, finalmente, la inhibición del crecimiento del parásito bloqueando la NADH-fumarato reductasa.

Este fármaco se absorbe rápidamente por el tracto digestivo. A las 2-4 horas se alcanzan las concentraciones plasmáticas máximas, que van disminuyendo luego con una semivida de 12 horas aproximadamente. La biodisponibilidad de un comprimido de 100 mg de benznidazol es del 92%. Se metaboliza parcialmente en el organismo y todos los metabolitos se eliminan rápidamente por la orina y las heces con una vida media de eliminación en torno a 10.5-13.6 horas (185)(182).

Este compuesto tiene una actividad relevante en las fases aguda y temprana de la infección por *T. cruzi*, alcanzando la curación, con la negativización serológica correspondiente, en hasta el 100% de los casos con enfermedad congénita tratados durante el primer año de vida (63)(186), y en el 76% de los pacientes con enfermedad aguda (187). Este porcentaje desciende a medida que pasan los años desde la adquisición de la infección y, por tanto, durante la fase crónica la tasa de curación baja hasta el 60-93% en los niños de hasta 13 años (188)(189) y hasta el 2-40% en adultos con enfermedad crónica avanzada (190)(187)(191).

En general, el tratamiento con benznidazol se ha preferido frente a nifurtimox por varias razones: Su tolerabilidad, la presencia en menor medida de efectos secundarios, su penetración tisular y su posible mayor eficacia. Aún así, es necesaria una estrecha vigilancia de la toxicidad del fármaco y como hemos comentado está lejos de ser un “fármaco ideal” (12). Un último estudio publicado en 2015, llamado *BENEFIT* realizado en pacientes con cardiopatía estructural, y tratados de forma aleatoria con benznidazol o con placebo mediante vía oral, indica una disminución considerable de la detección de parásitos circulantes en sangre, pero no impide de manera significativa la progresión de la afectación cardíaca, en comparación con aquellos pacientes que recibieron placebo después de cinco años de seguimiento (178).

Los posibles efectos adversos descritos en relación con benznidazol son (192):

- Dermatológicos: Exantema cutáneo leve-moderado, como reacción de hipersensibilidad, que se caracteriza por la presencia de una dermatitis generalizada con erupciones cutáneas en tronco y extremidades. Es el efecto secundario más frecuente afectando en torno al 25-50% de los pacientes, y aparece en las dos primeras semanas tras el inicio del tratamiento. La causa parece estar en relación con una reacción idiosincrática mediada por células T, que involucran linfocitos CD4 y CD8 (193)(194). Este exantema no impide la interrupción terapéutica, salvo en casos de reacciones cutáneas graves en los que sí se finalizaría el tratamiento administrando corticoides y antihistamínicos sistémicos. Aún así, esto conlleva un porcentaje moderado de abandonos terapéuticos con una inadecuada adherencia (179)(12).

- Digestivos: La intolerancia digestiva (dolor abdominal, náuseas), es otro de los efectos secundarios más frecuentes, afectando en torno al 5-15% de los casos que reciben tratamiento. Suele aparecer en la primera semana de tratamiento, aunque habitualmente es leve, y desaparece de forma espontánea a los pocos días sin necesidad de la suspensión del fármaco.

- Hematológicos: Han sido descritas alteraciones como la leucopenia o trombocitopenia, aunque siguen siendo mucho menos frecuentes en comparación con las reacciones cutáneas o digestivas. Debido a esto, existe la necesidad de un seguimiento más exhaustivo del paciente con analíticas de sangre para comprobar su normalidad. Complicaciones más graves pero también más raras son: La agranulocitosis, que comienza con neutropenia, odinofagia, fiebre y septicemia, o la púrpura trombocitopénica en la que se observa una descenso brusco de plaquetas, con petequias e incluso sangrado de mucosas. Ante estos signos y síntomas, se debe suspender inmediatamente el tratamiento e iniciar terapia antibiótica si existen indicios de sepsis y tratamiento con corticosteroides para el control de la agranulocitosis y la púrpura trombocitopénica (169).

- Neurológicos: Cefalea, vértigo, trastornos del sueño, y más infrecuente la aparición de parestesias o polineuritis periférica. Estos efectos se asocian con la dosis recibida y, una vez se instauran, obligan a suspender inmediatamente el tratamiento.

Otros síntomas generales e inespecíficos como la fiebre, artralgias o mialgias, anorexia, astenia y malestar general afectan a un porcentaje nada desdeñable (40%), pero en la mayoría de los pacientes suelen ser leves y autolimitados sin necesidad de interrumpir el tratamiento (169).

El tratamiento se interrumpe en el 9-29% de los casos, a pesar de que estas reacciones son reversibles y graves en menos del 1% de los casos (178)(195)(196). Tampoco se han asociado una mayor frecuencia de efectos adversos con la dosis diaria de fármaco (94)(197).

NIFURTIMOX

El nifurtimox es un 5-nitrofurano [3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamino)-2,3,5,6-tetrahidro-4*H*-1,4-tiazina-1,1-dióxido] (Figura 20), comercializado por Bayer en 1967 con el nombre comercial de Lampit®. A pesar de que durante años ha sido utilizado como tratamiento de primera línea, hoy en día el suministro del fármaco no es continuo en determinados países (Brasil, Argentina, Chile o Uruguay), e incluso en algunos se mantiene retirado del mercado por sus efectos adversos y potencial toxicidad del material genético (198)(169).

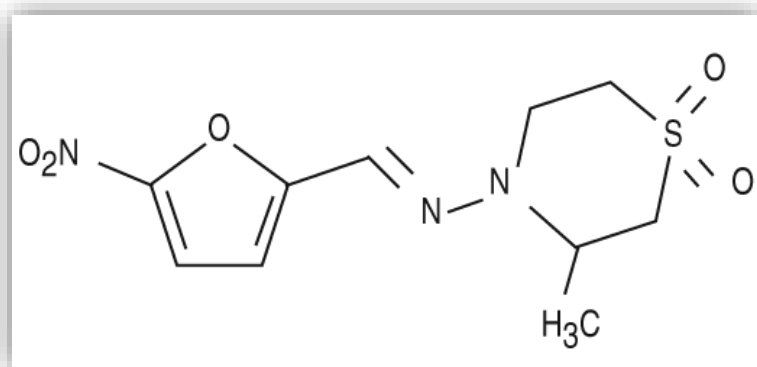


Figura 20: Estructura química del fármaco nifurtimox. Fuente:
<http://www.farmaciasahumada.cl/fasa/MFT/PRODUCTO/P10470.HTM> (199).

Este fármaco se administra por vía oral con las dosis que se indican en el apartado anterior y se absorbe casi por completo después de su administración. Las concentraciones máximas se alcanzan 1-3 horas después de tomar el medicamento, y tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria y también la barrera sanguino-cerebral. Se metaboliza casi por completo, detectándose en orina la presencia de metabolitos básicos, ácidos y neutros y sus concentraciones plasmáticas disminuyen

rápidamente, con una semivida de 2 a 5 horas, dejando de ser detectables 24 horas después de la última toma. Hasta un 1% de la dosis se excreta con la orina en forma intacta (199). Sus tasas de curación rondan entre un 86% si se refiere a niños menores de 14 años durante la fase crónica o un 7-8% si se trata de adultos (179)(200).

Los efectos adversos con nifurtimox tienen una frecuencia en torno a 43,0% - 97,5%. Los más frecuentes son anorexia, pérdida de peso, trastornos neurológicos (irritabilidad, insomnio, desorientación, cambios de humor, convulsiones, alucinaciones, parestesias y neuropatía periférica), manifestaciones digestivas como dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos y, ocasionalmente, fiebre y erupción cutánea. Algunos de estos síntomas pueden ser paliados con diazepam, cimetidina y metoclopramida, entre otros (201)(169).

El tratamiento se suspende por mala tolerancia en el 14,5 - 75% de los casos (179)(202).

1.9.4 Tratamientos sintomáticos

AFECTACIÓN CARDIACA

A pesar de múltiples estudios realizados hasta el momento, se desconocen la existencia de marcadores precoces que nos indiquen la curación o progresión de la miocardiopatía, especialmente en pacientes que se mantienen asintomáticos (203)(204). Solo los test serológicos nos indican curación y dicha negativización puede aparecer en los últimos años de vida. Las técnicas de PCR tampoco nos indican curación y no están claramente asociadas a la progresión o afectación cardiaca (178). Por todo esto, se necesita un control más exhaustivo de los pacientes, con múltiples visitas médicas y exámenes complementarios, incluso para aquellos que no necesariamente presentan sintomatología. Durante este seguimiento se insistirá en el control de factores de riesgo cardiovascular, además de controlar las síntomas de la propia infección, por tanto, se realizará una entrevista clínica completa, un examen físico al menos una vez al año, un electrocardiograma anual, un Holter y un ecocardiograma cada 2-3 años según los síntomas que presente el paciente y la gravedad de la enfermedad (173)(205)(120).

El tratamiento médico de la insuficiencia cardiaca sigue el mismo protocolo que si se produjese por otras causas. Sin embargo, los pacientes con enfermedad de Chagas mantienen con mayor frecuencia una tensión arterial baja y un mayor porcentaje de arritmias, por lo que el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de la

angiotensina (IECAS) y beta bloqueantes no va a ser tan bien tolerado con respecto a otros pacientes (206)(207). El objetivo de tratar la insuficiencia cardiaca es enlentecer la evolución de la remodelación ventricular y afectación de la función ventricular (118)(183). Las recomendaciones a seguir en este periodo son: Dieta hiposódica, restricción hídrica, actividad física frecuente y tratamiento diurético en caso de que exista retención hídrica (117)(208).

Existen algunos estudios observacionales que sugieren la utilidad de la amiodarona para mejorar la supervivencia de estos pacientes, con alto riesgo de muerte súbita por arritmia (99,110)(209). Este tratamiento estará indicado, por tanto, en aquellos que presenten taquicardia ventricular sostenida y para aquellos con taquicardia ventricular no sostenida con disfunción miocárdica (209).

Se debe proceder a una estadificación del riesgo tromboembólico en cada paciente. Se aconseja el tratamiento con antiagregación en aquellos que presenten miocardiopatía, y con anticoagulación a aquellos que hayan tenido una historia previa de tromboembolismo, disfunción ventricular o fibrilación auricular con evidencia de trombo mural (118)(183).

La implantación de marcapasos es el tratamiento de elección en pacientes que presenten bradiarritmias y trastornos de conducción graves. Esta bradicardia puede estar agravada con el uso de fármacos como digoxina, amiodarona y beta bloqueantes (110).

En los casos de taquicardia ventricular sostenida refractaria o inestabilidad hemodinámica, se sugiere la implantación de un desfibrilador automático implantable (DAI), (210)(118)(183). Aunque sus indicaciones no están del todo establecidas en la enfermedad de Chagas con miocardiopatía, se cree que tras su implantación existe una mejoría de la clase funcional, la fracción de eyección ventricular y la supervivencia (211)(212)(213).

Como última alternativa a los casos de insuficiencia cardiaca terminal se encuentra el trasplante cardíaco (214).

AFECCIÓN DIGESTIVA

- Afectación esofágica: En este momento no existe un tratamiento específico para los síntomas leves producidos por la enfermedad de Chagas. Aún así, existen una serie de

medidas dietéticas que ayudan el tránsito de alimentos y líquidos a través del esfínter esofágico inferior, como por ejemplo una correcta masticación, evitar alimentos fríos y muy calientes y eliminar las comidas durante la noche (125).

Como tratamiento sintomático, a la espera de una medida más definitiva, se sugiere el uso de medicamentos relajantes del esfínter esofágico inferior, como el nifedipino o nitrato, ambos administrados vía sublingual y antes de la ingesta de alimentos (118)(120).

En los casos graves, el manejo sería a través del endoscopio con la inyección endoscópica de toxina botulínica en la región del esfínter, o la dilatación con globo neumático con una eficacia transitoria habitualmente de meses. Como última opción se indicaría la cirugía mediante la miotomía laparoscópica de Heller y la fundusplicatura, y en casos más extremos la propia resección esofágica (215)(216).

- Afectación colónica: En fases iniciales se aconseja realizar una dieta rica en fibra con abundante ingesta de líquidos, así como el uso de laxantes y enemas ocasionales si existiese estreñimiento. La impactación fecal o fecaloma, puede suceder a medida que avanza la afectación intestinal, requiriendo un vaciado manual además del uso de enemas para su completa evacuación. Aquellos pacientes con diagnóstico de megacolon, que a pesar de las medidas previamente descritas no mejoren, tendrán como última opción medidas invasivas como la cirugía, con su resección intestinal correspondiente. En caso de aparición de un vólvulo sigmoideo, se utilizaría la técnica endoscópica para su desvolvulación, y así evitar una cirugía en la medida de lo posible (217).

CORTICOESTEROIDES

En la actualidad, el benznidazol sigue siendo el fármaco preferido en el tratamiento en la enfermedad de Chagas tanto en la fase aguda como en la crónica. Pero las cifras de pacientes que sufren eventos adversos, principalmente dermatológicos, están muy lejos de ser las ideales (218)(219). El incremento de estos efectos secundarios (25-50%) y, como consecuencia, la mala adherencia al tratamiento, ha hecho que adquiera mayor relevancia la necesidad de estudiar el beneficio/riesgo de los corticoides en la enfermedad de Chagas (12).

Los glucocorticoides tienen efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune, y por tanto se emplean en pacientes con trastornos inflamatorios, alérgicos e inmunológicos. En

concreto, deterioran algunas funciones de las células T, y a dosis moderadas-altas (>40 mg por día de prednisona en adultos) inducen la apoptosis de dichas células (220).

Si el tratamiento se prolonga en el tiempo y se mantiene de forma crónica, pueden aparecer eventos adversos como la supresión del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, síndrome de Cushing y alteraciones mentales. Además, la terapia con glucocorticoides sistémicos se asocia con un aumento inmediato en el riesgo de infección, especialmente con patógenos bacterianos, virales y fúngicos comunes, debido a sus efectos inhibitorios sobre la función de los fagocitos. Son ejemplo de ello, infecciones latentes con patógenos bacterianos comunes como el *Mycobacterium tuberculosis*, el virus varicela-zoster o el parásito *Strongyloides stercoralis* que se pueden reactivar en pacientes sometidos a largos periodos de tratamiento con corticoides (221).

Estos eventos, incluyendo el riesgo de infección, van a depender de la dosis de administración del corticoide, la intensidad de la terapia, el tiempo de duración, las propiedades farmacocinéticas del fármaco, el metabolismo de cada paciente, etc... (222)(223)(224).

Teniendo en cuenta todo esto, el tratamiento con corticoides está contemplado ante situaciones de emergencia clínica o agudización de un cuadro inflamatorio o alérgico si además este periodo de tratamiento se prevé relativamente corto. Por ello, uno de los objetivos que se plantean en la actualidad es la premedicación con corticoides, para evitar reacciones alérgicas o de hipersensibilidad, tras su acción directa en la respuesta inflamatoria del huésped (225).

Hasta el momento existen pocos estudios sobre la terapia combinada con benznidazol y metilprednisolona como estrategia profiláctica de reacciones cutáneas, y no obtienen resultados claramente significativos (219). En concreto, *Górgolas et al.*, publicó un estudio compuesto por 39 pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, donde se mostró que los pacientes tratados con benznidazol (17p) en dosis progresivamente crecientes durante los primeros 9 días (100 mg/24h 3 días, después 100 mg/12 horas 3 días, posteriormente 100 mg/8 horas 3 días y finalmente dosis plena de 5 mg/kg/día, dividido en tres dosis al día durante 60 días) junto con metilprednisolona durante los primeros 9 días (16 mg/24 horas 3 días, después 8 mg/24 horas 3 días, y finalmente 4 mg/24 horas 3 días) presentaban mejor tolerancia, sin efectos secundarios graves dermatológicos, gastrointestinales o neurológicos, además de no describir ningún caso de

abandono de tratamiento. Por tanto, el empleo de una dosis progresiva de benznidazol junto con esteroides durante los primeros días podría ser una alternativa (219).

Por otro lado, existen algunas publicaciones con respecto al nifurtimox y el uso concomitante de corticoide, donde se describe ausencia de beneficio frente a los efectos adversos producidos por dicho fármaco (12)(226).

A día de hoy, se sigue desconociendo realmente la influencia de los corticoides sobre el tratamiento antiparasitario, la propia infección por *T. cruzi*, la negativización de la PCR o las pruebas serológicas. Esto indica la necesidad de realizar más ensayos aleatorizados que muestren por tanto si existe algún efecto nocivo del corticoide sobre dicho parásito o dicho tratamiento (219).

1.9.5 Nuevos tratamientos

Según la OMS, los requisitos necesarios para considerar un “fármaco ideal” como tratamiento para la enfermedad de Chagas, son los siguientes: Obtener la cura parasitológica tanto en los casos agudos como en los crónicos, conseguir la efectividad con dosis reducidas, generar una adecuada accesibilidad para todos los pacientes con un bajo coste, reducir lo máximo posible el número de efectos secundarios o teratogénicos, evitar el ingreso hospitalario para su administración y evitar la existencia de resistencias (179).

Como ya hemos especificado previamente, ninguno de los dos fármacos que hay disponibles en el mercado actualmente cumplen estos requisitos; teniendo una limitada actividad durante la fase crónica, necesitando la administración de 2-3 dosis diarias con dudosa accesibilidad y a un elevado coste, además de presentar múltiples efectos adversos y la existencia de algunas cepas con resistencias al tratamiento (179). El objetivo principal del tratamiento de esta enfermedad es la curación pero, actualmente, el único criterio que nos indica esta premisa es la conversión de los resultados serológicos, y esto puede suceder en unos 10 o 20 años, si se trata de pacientes en fase crónica (37)(187). Por todo esto, se crea una necesidad imperiosa de investigar en nuevos tratamientos como alternativa a los que ya existen, tras más de 40 años sin nuevas opciones terapéuticas para la fase crónica de la enfermedad.

Hasta el momento, fármacos como el alopurinol y los triazoles (inhibidores de la biosíntesis del ergosterol), han sido los elegidos para múltiples estudios a través de ensayos clínicos o métodos observacionales. Los resultados obtenidos, tras el uso de la

monoterapia con ravuconazol y posaconazol, o la combinación con BZ y posaconazol, no han mostrado eficacia como tratamiento para la enfermedad de Chagas (104)(227)(228).

Otros fármacos estudiados para esta misma enfermedad pero sin resultados que mostrasen su eficacia para la eliminación del parásito en sangre han sido el alopurinol, risedronato y pentamidina entre otros (35)(120).

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

1. Objetivo principal:

- Determinar el papel de la RMN cardíaca y su utilidad, con respecto a otras herramientas diagnósticas cardíacas, en los pacientes con enfermedad de Chagas durante la fase crónica.

2. Objetivos secundarios:

- Conocer las características clínicas y epidemiológicas de la población con enfermedad de Chagas atendidas en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid.
- Describir las alteraciones cardiológicas y gastrointestinales en pacientes con infección crónica por *T. cruzi*.
- Evaluar el impacto del tratamiento antichagásico en el resultado de las diferentes pruebas cardiológicas.
- Valorar la utilidad de la PCR en el seguimiento clínico del paciente con enfermedad de Chagas.
- Estudiar la adherencia al tratamiento terapéutico en los pacientes con enfermedad de Chagas
- Analizar “in vitro” el efecto de la metilprednisolona sobre la capacidad anti-*Trypanosoma cruzi* de benznidazol.

MATERIAL Y MÉTODOS

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 SERIE CLÍNICA

3.1.1 Población de estudio

Se realizó un estudio observacional y descriptivo, para definir las principales características clínicas y epidemiológicas de todos los pacientes con enfermedad de Chagas atendidos desde enero de 2009 a diciembre de 2018 en el hospital universitario terciario Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Todos los casos fueron diagnósticos serológicamente, y evaluados con una historia médica completa incluyendo exploración física, datos demográficos y pruebas complementarias como la radiografía de tórax, electrocardiograma de 12 derivaciones y ecocardiograma transtorácico bidimensional.

3.1.2 Interpretación pruebas cardiológicas

Entre las pruebas cardiológicas realizadas se incluyen: Radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiograma, holter de 24 horas y la resonancia magnética cardíaca.

-En la radiografía de tórax se consideró la presencia de cardiomegalia cuando la silueta cardíaca era mayor de la mitad de la amplitud del tórax (229).

El electrocardiograma (ECG) se realizó durante al menos 10-30 segundos mediante el cardiógrafo Philips PageWriter TC70. El holter ECG, consiste en la monitorización continua de la actividad eléctrica cardíaca durante 24 horas seguidas, reuniendo dicha información electrocardiográfica con el fin de descartar posibles taqui-bradiarritmias patológicas.

Entre las anomalías de ECG atribuibles a esta enfermedad se incluyeron (229)(230):

- Bloqueos de rama derecha (complejo QRS $>0,12$ segundos, con un patrón en V1 rSR') e izquierda (complejo QRS $>0,12$ segundos con un patrón en V1 de rS o QS).

- Bloqueo fascicular anterior (eje izquierdo, morfología qR en I y aVL y rS en II, III y aVF) y posterior izquierdo (eje derecho, morfología de rS en I y aVL y qR en II, III y aVF).
- Presencia de ondas Q.
- Cambios ST-T: elevación de punto J, con retraso en la porción descendente de una onda R y concavidad del segmento ST en relación a la repolarización precoz. Elevación o descenso del segmento ST >1 mm o alteración de ondas T.
- Bloqueo auriculoventricular (AV).
- Bajo voltaje QRS.
- Bradicardia sinusal (<60 latidos por minuto).
- Fibrilación auricular.

Se registraron los ECG que presentaban desviación izquierda del eje, definido como desviación del eje entre -30° y -90° , pudiendo deberse esto a una variante de la normalidad, más característica en pacientes con obesidad y ancianos, o por otras causas como hipertrofia ventricular izquierda, bloqueo de rama izquierda, hemibloqueo anterior izquierdo, IAM pared inferior...

Un grupo de expertos en ecocardiografía valoró a los pacientes, utilizando un sistema de ecocardiograma transtorácico bidimensional Philips iE33, con opción de visualización tridimensional inclusive, y Philips HD 15. Se evaluaron los siguientes aspectos:

- Dimensiones de aurícula y ventrículo izquierdos y aorta (modo M y bidimensional).
- La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) se calculó a partir de las vistas apicales de 4 y 2 cámaras utilizando el método de Simpson (biplano).
- Alteraciones segmentarias de la contractilidad (planos convencionales eje largo paraesternal, eje corto paraesternal, plano 4 cámaras y 2 cámaras).
- Función diastólica teniendo en cuenta los valores normales de referencia.
- Alteraciones valvulares y cortocircuitos mediante doppler continuo y pulsado, además de doppler-color.

- Grosor del tabique interventricular (IVST) para descartar hipertrofia de VI (HVI). Se obtuvieron medidas en telediástole siguiendo las recomendaciones habituales. La HVI se definió como $IVST \geq 11$ mm.

Los valores normales de referencia están de acuerdo con las directrices de la Asociación Europea de Imagen Cardiovascular (231).

El estudio de resonancia magnética cardíaca (RMN cardíaca) se realizó en dos equipos, Philips Achieva 1,5T y Siemens MAGNETOM Verio 3T. Según el protocolo estandarizado, se realizaron secuencias anatómicas (*Half-Fourier single shot turbo (fast) spin echo*, *Single shot TSE* y *HASTE*) en los planos ortogonales en respiración libre en al menos un plano (axial, coronal y sagital), secuencias cine en los planos intrínsecos cardíacos (eje corto de ambos ventrículos, eje largo de ventrículo izquierdo, cuatro cámaras, tres cámaras de ventrículo izquierdo y tracto de salida de ventrículo izquierdo), secuencias potenciadas en T2 con supresión grasa sobre al menos tres ejes intrínsecos cardíacos (eje corto de ambos ventrículos, eje largo de ventrículo izquierdo, cuatro cámaras) y secuencias con pulso de inversión recuperación para estudiar el realce tardío del miocardio tras la administración de contraste intravenoso. Todos los pacientes con diagnóstico de enfermedad de Chagas vistos en nuestro centro que fueron sometidos a RMN cardíaca aceptaron la realización de la misma. Fueron excluidos todos aquellos pacientes que tenían dispositivo cardíaco tipo marcapasos o DAI, presentaban claustrofobia, perdían seguimiento de la consulta, embarazadas o mujeres en periodo de lactancia y pacientes con alergia al contraste.

Los pacientes con enfermedad de Chagas se clasificaron de acuerdo con la clase funcional NYHA (*New York Heart Association*) (232).

Tabla 4: Clase funcional NYHA (*New York Heart Association*). Valoración funcional de la insuficiencia cardiaca. Fuente: (220).

Clasificación funcional NYHA	
Clase I	No limitación de la actividad física. La actividad ordinaria no ocasiona excesiva fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
Clase II	Ligera limitación de la actividad física. Confortables en reposo. La actividad ordinaria ocasiona fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
Clase III	Marcada limitación de la actividad física. Confortables en reposo. Actividad física menor que la ordinaria ocasiona fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
Clase IV	Incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin disconfort. Los síntomas de insuficiencia cardiaca o de síntomas anginoso pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza cualquier actividad física, el disconfort aumenta.

La segunda clasificación que hemos tenido en cuenta para describir la cardiopatía chagásica es la definida por Kuschnir (233). En ella se evalúan los resultados obtenidos mediante el electrocardiograma (ECG), la radiografía de tórax y la clasificación NYHA (232).

- Estadio 0: Electrocardiograma y radiografía de tórax normal, sin sintomatología asociada.
- Estadio 1: Alteraciones electrocardiográficas y NYHA I.
- Estadio 2: Alteraciones electrocardiográficas, cardiomegalia moderada objetivada en la radiografía de tórax sin signos de insuficiencia cardiaca y NYHA I.
- Estadio 3: Alteraciones electrocardiográficas, cardiomegalia grave y signos compatibles con insuficiencia cardiaca y/o NYHA>I.

Por otro lado, nuestros pacientes se clasificaron en cuatro grupos teniendo en cuenta el ECG, la RMN y los hallazgos ecocardiográficos utilizando una adaptación de la Clasificación Echostage (234):

- Grupo 1: ECG normal, ecocardiografía normal y RMN normal
- Grupo 2: Anomalías en el ECG, con ecocardiografía y RMN normal.
- Grupo 3: Anomalías en el ecocardiograma con RMN normal.
- Grupo 4: Anomalías en la RMN independientemente de los hallazgos en el ECG y el ecocardiograma.

3.1.3 Interpretación pruebas digestivas

Para estudiar el grado de estreñimiento que presentaban nuestros pacientes se siguieron los criterios Roma III según consenso elaborado por expertos en trastornos funcionales digestivos (235).

Se consideró estreñimiento crónico la aparición de los siguientes puntos:

1. Presencia de dos o más de los siguientes criterios:
 - Esfuerzo defecatorio en al menos el 25% de las deposiciones.
 - Heces duras en al menos el 25% de las deposiciones.
 - Sensación de evacuación incompleta en al menos el 25% de las deposiciones.
 - Sensación de obstrucción anal o bloqueo anorrectal en al menos el 25% de las deposiciones.
 - Maniobras manuales para facilitar la defecación en al menos el 25% de las deposiciones.
 - Menos de 3 deposiciones a la semana.
2. Presencia poco frecuente de heces sueltas sin empleo de laxantes.
3. Criterios insuficientes para el diagnóstico del síndrome de intestino irritable.

La afectación digestiva se evaluó mediante las siguientes pruebas complementarias: tránsito esofagogastroduodenal, enema de bario y manometría esofágica.

La técnica del tránsito esofagogastroduodenal tiene como objetivo observar posibles alteraciones del tracto digestivo superior que justifiquen síntomas como el reflujo gastroesofágico (RGE), disfagia, náuseas o vómitos. Dicha prueba consiste en ingerir una cantidad de bario recubriendo la superficie del tracto digestivo superior para

posteriormente, con la realización de una radiografía de tórax, poder observar posibles alteraciones.

La manometría esofágica se usa con el fin de observar posibles alteraciones en la motilidad del esófago comprendiendo el estudio del esfínter esofágico superior, el cuerpo esofágico y la unión esófago-gástrica. Para ello, se introduce una sonda a través de la nariz con el paciente en ayunas durante las 6 horas previas, y en posición de decúbito supino. La sonda se coloca a lo largo de toda la extensión esofágica, incluyendo unos centímetros en cavidad gástrica. Una vez colocada la sonda, se realiza una captura con microtransductores de alta resolución (ManoScan360 TM de Given Imaging). En la primera parte se mantiene al paciente sin tragar durante 30 segundos, posteriormente se administran 10 degluciones líquidas de 5cc de agua, y por último se realiza el test de degluciones múltiples con 100cc de agua. Una vez en sedestación, se repiten dos series; una de 5 degluciones líquidas de 5cc de agua y otra de degluciones múltiples con 100cc, finalizando así dicha prueba.

El enema de bario se lleva a cabo a través de una serie de imágenes radiográficas de la parte inferior del abdomen tras la administración de un enema de bario con el fin de visualizar posibles anomalías en colon ascendente, el colon transversal, colon descendente, sigma y recto.

3.1.4 Estudio microbiológico: test serológicos y PCR.

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones internacionales, y se estableció cuando el resultado de dos técnicas serológicas diferentes, realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante, fueron positivas (219). Se consideraron como indeterminados aquellos casos que solo presentaban una serología positiva.

Las técnicas diagnósticas, realizadas en el departamento de Microbiología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, fueron las siguientes:

- Inmunocromatografía de membrana (onSite Chagas Ab Combo Rapid Test).
- ELISA por detección colorimétrica (Chagas Alere Freedom).
- Quimioluminiscencia (Architect Chagas Reagent Kit).

Por otro lado, se empleó una técnica de biología molecular con PCR en tiempo real dirigido al ADN satélite (SatDNA) de *T. cruzi* (RealCycler CHAG), detectado en sangre periférica de acuerdo con los protocolos definidos y estandarizados (155)(154).

3.1.5 Análisis de datos: estadística.

El análisis de datos se llevó a cabo a través del software SPSS para Windows de IBM® SPSS®, versión 25.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EE.UU). En el estudio descriptivo, se han realizado recuentos absolutos y relativos utilizando tablas de frecuencia y gráficos. Las variables continuas se representaron como la media \pm desviación estándar (DE), la mediana y el rango, mientras que las frecuencias y los porcentajes se calcularon para las variables cualitativas. El análisis univariado se realizó con Kruskal-Wallis para variables cuantitativas y la prueba de Chi-cuadrado o prueba de Fisher para las variables cualitativas. Se realizó un estudio estadístico comparativo de los porcentajes de disolución entre las diferentes formulaciones mediante la prueba t de Student pareada. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se aplicó para comparar sus valores de CI_{50} y se consideró que un valor p de <0.05 indicaba significación estadística.

3.1.6 Consideraciones éticas

El protocolo de estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Ética del IIS-Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España) y los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki revisada en 2000. Todos los procedimientos del estudio se realizaron como práctica clínica estándar.

La información de los pacientes y su participación fue tratada de forma anónima y confidencial, teniendo acceso a dichos datos solo los investigadores del estudio.

3.2 ENSAYO EXPERIMENTAL “IN VITRO”

Durante el trabajo experimental “in vitro” se ha utilizado la cepa de *Trypanosoma cruzi* CL clon B5 *lacZ*. El término *lacZ* hace referencia a la modificación genética de esta cepa a través de la introducción de la enzima β -galactosidasa de *Escherichia coli* cuyo objetivo es producir la hidrólisis del sustrato cromogénico rojo de clorofenol β -D

galactopiranosido (CPRG) a rojo de clorofenol. Esto da lugar a un cambio en la coloración de amarillo a rojo, pudiendo interpretarse mediante espectrofotometría asociando dicha absorbancia a la proporción del número de parásitos vivos (236).

Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Unidad de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. La materia prima del benznidazol fue administrada por LAFEPE, Pernambuco, Brasil. La penicilina se obtuvo de los Laboratorios Ern, S.A (Barcelona, España) y la Estreptomicina de los Laboratorios Reig Jofré, S.A (Barcelona, España). La sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2-hidrato (EDTA), la glucosa y el NaHCO₃ se consiguió a través de Panreac (Barcelona, España). El suero bovino fetal (SBF) se obtuvo de Gibco® (Life Technologies, España). El Medio Esencial Mínimo (MEM), HEPES, hemina y sal sódica de resazurina fueron administrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El caldo de infusión hepática, la triptosa y la tripsina se compraron en Difco (Detroit, MI, EE. UU.) y el CPRG procedía de Roche (Mannheim, Alemania).

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento de la cepa de *T. cruzi* (237) fue LIT (*Liver Infusion Tryptose*) y el medio utilizado para el mantenimiento de cultivos celulares de fibroblastos L929 fue MEM (*Minimal Essential Medium*) (184).

3.2.1 Mantenimiento de cultivos celulares

Una vez que se descongelaron los cultivos mediante el calentamiento progresivo a 37 °C, se procedió al cambio del medio 24 horas más tarde con el fin de retirar el DMSO (utilizado al 5% como agente crioprotector en la congelación) y las células no adheridas al recipiente de cultivo celular. Los cultivos de fibroblastos L929 se mantuvieron en medio MEM y se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. De forma periódica, el medio empleado y ya consumido se sustituyó por medio fresco (238).

3.2.2 Mantenimiento de cultivos de epimastigotes

Tras el proceso de descongelación de los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL clon B5 *lacZ*), se llevó a cabo la dilución con medio LIT suplementado y se incubaron en una estufa a 28 °C. Semanalmente se realizó el cambio de medio consumido con medio

fresco para así mantener la fase de crecimiento exponencial del parásito. De forma rutinaria se observaron mediante microscopía dichos cultivos para asegurar una adecuada viabilidad de los mismos (238).

3.2.3 Obtención de amastigotes intracelulares

La obtención de amastigotes se consiguió a través de TDC (tripomastigotes derivados de cultivo) liberados previa infección de cultivos de fibroblastos L929 (238).

3.2.4 Ensayos de actividad “in vitro”

3.2.4.1 Actividad sobre epimastigotes de la cepa CL B5 lacZ

En concreto, las concentraciones finales de benznidazol (BZ) usadas (de 256 a 8 μ M) junto con los procedimientos empleados se basaron en los experimentos previamente estandarizadas por Vega et al., 2005 (239) y Fonseca-Berzal et al., 2013 (240).

Con respecto a la metilprednisolona (MPRD), se calcularon sus concentraciones en base a una dosis estándar de 48 mg empleada en un paciente aleatorio de 75 Kg de peso, teniendo en cuenta que su peso molecular es de 374,47 g/mol y cuyo volumen de distribución es 1,2 l/kg. Dado que nuestro estudio pretendió tener unos resultados más amplios con concentraciones mayores y menores con respecto a la anteriormente calculada, las concentraciones finales fueron de 2,128 a 0,0665 μ g/ml.

Estos experimentos se realizaron sobre cultivos axénicos de epimastigotes en fase de crecimiento exponencial. Los parásitos se sembraron en placas de fondo plano y 96 pocillos, en cada uno de los cuales se colocó un volumen de 200 μ l, con una distribución de $2,5 \times 10^5$ epimastigotes/ml junto con el fármaco a estudiar (Figura 21).

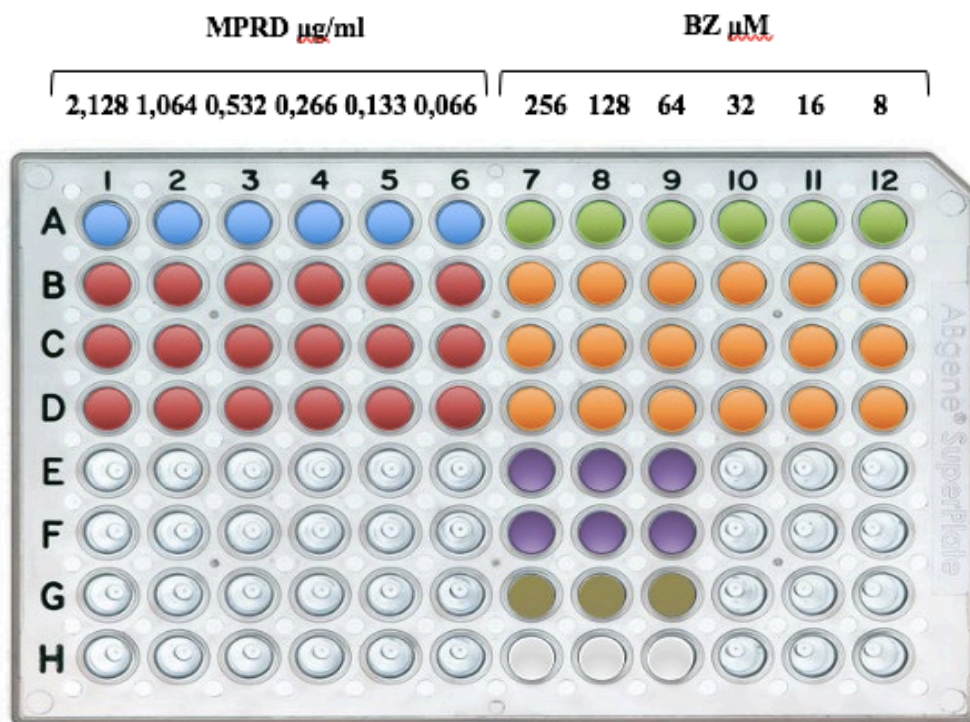


Figura 21: Representación de los ensayos “in vitro” con epimastigotes.

- medio LIT + MPRD
- medio LIT + BZ
- cultivo de parásito + MPRD
- cultivo de parásito + BZ
- control de crecimiento: cultivo de parásito
- control positivo: cultivo de parásito + DMSO 10%
- blanco: medio LIT

Cada concentración se ensayó por triplicado, y además se incorporó un control de crecimiento (formado por cultivo de epimastigotes sin tratar), un control positivo (control de DMSO 10%) y un control de medio LIT. Asimismo se realizó un control interno con BZ como fármaco de referencia. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 horas.

Posteriormente, se añadió 50 μl por pocillo de una solución de CPRG en Tritón X-100 0,9% pH 7,4 (concentración inicial de 1 mM) y se mantuvo a una temperatura de 37 °C durante 3 horas para propiciar la actividad de la β -galactosidasa. Una vez finalizado esto,

se procedió a la lectura de la absorbancia mediante espectrofotometría a 595 nm (ELx808 ELISA reader, Biotek Instruments Inc.). A partir de aquí, se calculó la actividad del compuesto frente a epimastigotes en forma de porcentaje utilizando la siguiente fórmula y comparando la absorbancia de los pocillos tratados con respecto a los pocillos de control de crecimiento (184):

$$\%AE = 100 - \left[\frac{A_E - A_{EM}}{A_{CC} - A_M} \right] \times 100$$

A_E hace referencia al valor medio de absorbancia de los pocillos experimentales (parásito tratado), A_{EM} al fármaco experimental en medio (fármaco en estudio), A_{CC} a la absorbancia de los pocillos de control de crecimiento y A_M a la absorbancia del medio.

Como ya hemos comentado, se utilizó un grupo control de crecimiento con DMSO al 10% (control positivo), y cuya absorbancia se restó a los grupos experimentales y de control de crecimiento (184).

Los resultados obtenidos fueron la media de los tres experimentos realizados de forma independiente ($n = 3$), y su actividad se expresó como la media \pm la desviación estándar (DS). También se calculó la concentración a la que el fármaco produce la inhibición del crecimiento de los epimastigotes en un 50% (CI_{50}) (238).

3.2.4.2 Pruebas de citotoxicidad inespecífica en fibroblastos

Tras la realización de los ensayos experimentales frente a epimastigotes, se procedió a la elaboración de las pruebas de citotoxicidad con el objetivo de descartar cualquier efecto tóxico de los compuestos utilizados frente a fibroblastos L929 (241). Esto, se llevó a cabo utilizando el sustrato redox resazurina y posteriormente cuantificando su intensidad de fluorescencia (240,242).

Para llevar a cabo estos ensayos se escogió una placa de fondo plano y 96 pocillos distribuyendo en cada uno de ellos 100 μ l de MEM con 10.000 células/pocillo (243) (Figura 22). Tras mantener la placa durante 3 horas en una estufa a 37 °C, 5% CO_2 , y conseguir por tanto la adhesión de las células al fondo de la placa, se retiró el medio de cultivo y se añadió en cada uno de los pocillos 200 μ l de la solución a estudio. Estas

concentraciones se ensayaron por triplicado y se añadió un control de crecimiento celular, control de medio y control interno de BZ.

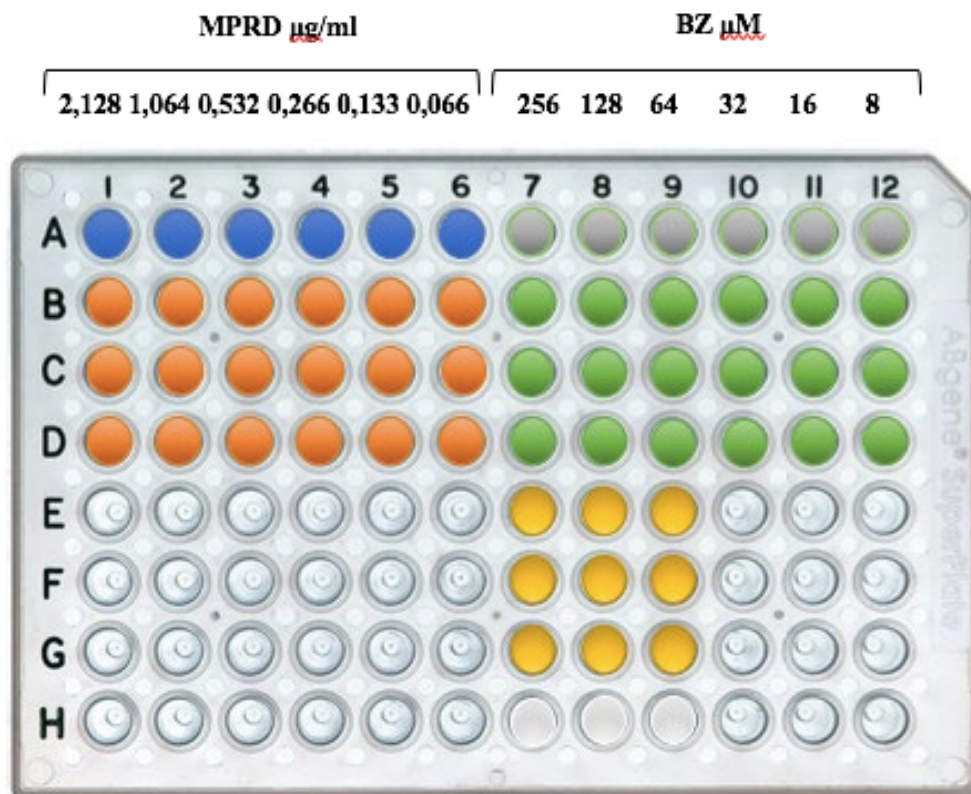


Figura 22: Representación de los ensayos “in vitro” de citotoxicidad inespecífica.

- medio MEM + MPRD
- medio MEM + BZ
- cultivo de células + MPRD
- cultivo de células + BZ
- control de crecimiento: cultivo de células
- blanco: medio MEM

La placa se mantuvo durante 72 horas en una estufa a 37 °C, 5% CO₂ y tras finalizar este tiempo se añadió la resazurina (20 μl por pocillo) en solución de PBS (2 mM, pH 7) y se incubó durante 3 horas en las mismas condiciones de temperatura y humedad. Dicho sustrato sufre una reducción a resorufina cambiando de color azul a rosa, y emitiendo una

señal de fluorescencia, cuya intensidad dependerá de forma directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (alamarBlue® Assay, U.S. Patent 5.501.9599).

Por tanto, se procedió a la lectura de intensidad de fluorescencia a 535 nm (excitación) y 590 nm (emisión) en un espectrofluorímetro de placas (Infinite 200 multifunctional microplate reader, Tecan) calculando los porcentajes de citotoxicidad (%C): (238)

- Fluorescencia

$$\%C = 100 - \left[\frac{IF_E - IF_{EM}}{IF_{CC} - IF_M} \right] \times 100$$

Donde IF_E indica la intensidad de fluorescencia media de los pocillos experimentales, IF_{EM} de los compuestos en medio, IF_{CC} indica el control de crecimiento e IF_M la intensidad únicamente del medio. Para su correcta interpretación los resultados de actividad se mostraron como la media y su DS tras haber realizado tres experimentos de forma independiente ($n = 3$). Se calculó además la concentración de fármaco necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (CL_{50}).

3.2.4.3 Actividad sobre amastigotes de la cepa CL B5 lacZ (forma intracelular)

Los ensayos con amastigotes se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 48 pocillos (Figura 23). Se distribuyeron por cada pocillo 10.000 fibroblastos L929 y se incubaron durante 2 horas a 37 °C y 5% CO₂. Una vez que las células se adhirieron al fondo de la placa, se infectaron con TDC en una proporción 1:6 (L929:TDC), manteniendo dicha placa en incubación durante 24 horas a 33 °C y 5% CO₂. Posteriormente, se retiraron los TDC que no consiguieron infectar la célula mediante lavados con PBS, y a continuación se añadieron 450 µl por pocillo de cada uno de los fármacos a ensayar en sus diferentes concentraciones y disueltos en medio fresco. La placa se incubó durante 7 días a 33 °C y 5% CO₂, y una vez terminado dicho periodo se añadieron 50 µl por pocillo de CPRG (concentración inicial de 4 mM) en Tritón X-100 3% pH 7,4 procediendo a una nueva incubación de la placa durante 3 h a 37 °C. Una vez finalizado este periodo se llevó a

cabo la lectura de absorbancia a 595 nm a través de un espectrofluorímetro de placas (Infinite 200 multifunctional microplate reader, Tecan)

Cada una de estas concentraciones se ensayó por triplicado, además de realizar controles de infección, controles de crecimiento celular, blancos de medio y un control interno de BZ.

La actividad frente a amastigotes (%AA), se determinó en presencia del sustrato CPRG mediante espectrofotometría, según las condiciones publicadas en Fonseca-Berzal et al. 2014 (243) y se expresó en porcentajes, a partir de la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left[\frac{A_E - A_{EM}}{A_{CI} - A_M} \right] \times 100$$

El valor A_E representa la absorbancia media de los pocillos experimentales, el valor A_{EM} de los compuestos en medio, A_{CI} se refiere al control de infección y A_M representa únicamente el medio. El valor medio de absorbancia de los pocillos de control de crecimiento celular se restó al grupo experimental y grupo control de infección como *background*.

Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado y de forma independiente ($n = 3$). Los resultados de actividad obtenidos se expresan mediante la media \pm DS, y se calculó la concentración necesaria de fármaco para inhibir el 50% (CI_{50}) del crecimiento parasitario.

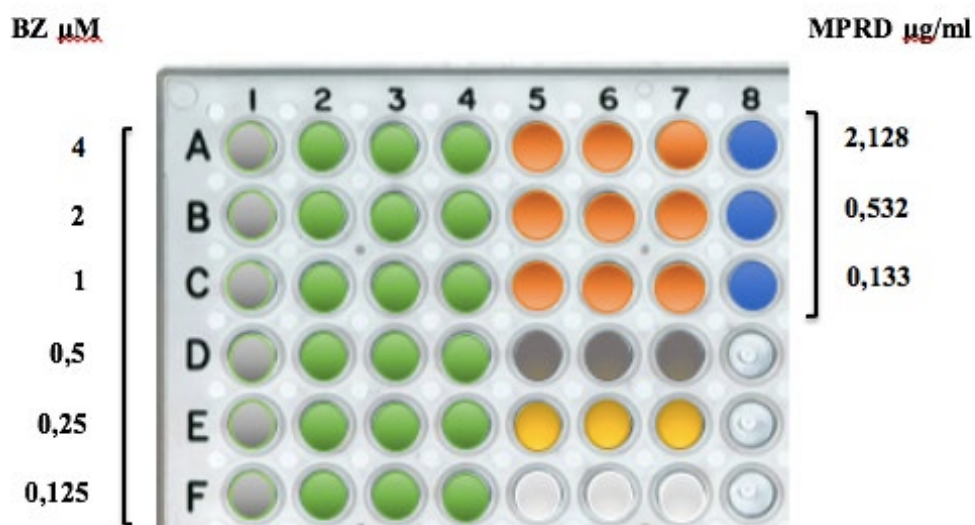


Figura 23: Representación de los ensayos “in vitro” con amastigotes.

- medio MEM + MPRD
- medio MEM + BZ
- cultivo de fibroblastos infectados + MPRD
- cultivo de fibroblastos infectados + BZ
- control de crecimiento: cultivo de fibroblastos
- control de infección: cultivo de fibroblastos infectados
- blanco: medio MEM

3.2.4.4 Actividad combinada de BZ y MPD sobre amastigotes de la cepa CL B5 lacZ

La metodología de estos ensayos se realizó exactamente igual que la explicada en el apartado 3.2.4.3.

Los resultados de actividad combinada con BZ y MPRD obtenidos se expresan mediante la media \pm DS de tres ensayos realizados de manera independiente ($n = 3$) (Figura 24). La concentración de BZ empleada para combinar con la MPRD es la equivalente a la concentración necesaria para inhibir el 50% (CI_{50}) del crecimiento del parásito intracelular.

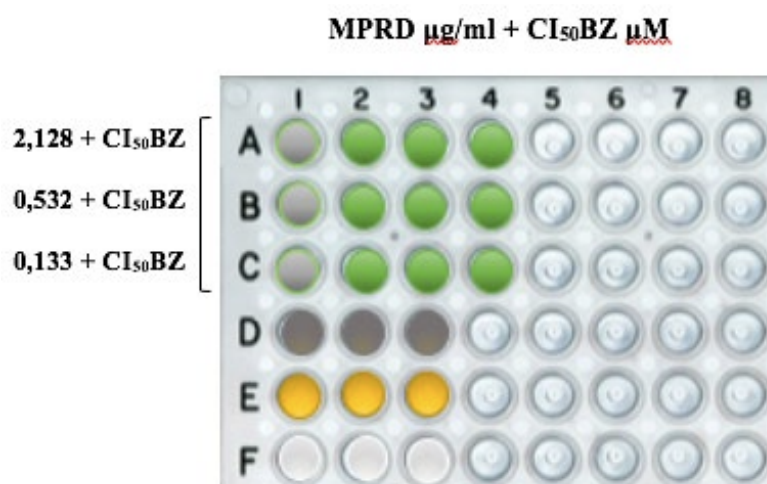







Figura 24: Representación de los ensayos “in vitro” de BZ y MPD sobre amastigotes.

-  medio MEM + tratamiento combinado
-  cultivo de fibroblastos infectados + tratamiento combinado
-  control de crecimiento: cultivo de fibroblastos
-  control de infección: cultivo de fibroblastos infectados
-  blanco: medio MEM

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1 SERIE CLÍNICA

4.1.1 Datos epidemiológicos

En nuestro estudio han sido evaluados un total de 147 pacientes (p), con una edad comprendida desde los 8 hasta los 76 años, siendo la edad media de 42,6 años \pm 12,4 (mediana 41). No se detectó ningún exitus.

La proporción de mujeres 118p (80,3%), es considerablemente mayor con respecto al sexo masculino (19,7%), y el principal país de origen de estos pacientes es Bolivia 136p (92,5%), siendo los siguientes más frecuentes Paraguay 5p (3,4%), Ecuador 3p (2%), El Salvador 1p (0,7%), Brasil 1p (0,7%) y Perú 1p (0,7%). Por otro lado, 54 pacientes (36,7%) referían tener antecedentes familiares con enfermedad de Chagas, principalmente sus madres y hermanos, 32p (21,8%).

42 mujeres (28,6%) se diagnosticaron a raíz de quedarse embarazadas, y la vía de transmisión descrita en nuestra muestra fue vectorial en 142p (96,6%), vertical en 4p (2,7%) y transfusional en solo uno de ellos (0,7%).

4.1.2 Datos clínicos

De los 147 pacientes que estudiamos en consulta, 77p (52,4%) se mantuvieron asintomáticos. Los síntomas cardíacos fueron los más frecuentes [36p (24,5%)], en segundo lugar, los gastrointestinales [31p (21,1%)] y por último, un subgrupo mucho más infrecuente describían síntomas neurológicos o reumatológicos que incluían cefalea, epilepsia o artralgias [3p (2%)].

La Tabla 5 muestra que los síntomas más comunes, referidos así en consulta, fueron el dolor torácico, el estreñimiento (según los criterios Roma III) (235), la pirosis y las palpitaciones .

Tabla 5: Sintomatología referida por los pacientes.

Síntomas: 70 pacientes (47,6%)	
Síntomas cardiacos: 36 pacientes (24,5%)	
Dolor torácico	11 (15,7%)
Palpitaciones	9 (12,9%)
Mareo	6 (8,6%)
Síncope	4 (5,7%)
Disnea*	4 (5,7%)
Edemas MMII	1 (1,4%)
Ortopnea	1 (1,4%)
Síntomas gastrointestinales: 31 pacientes (21,1%)	
Dolor abdominal	4 (5,7%)
Estreñimiento	13 (18,6%)
Pirosis	10 (14,3%)
Disfagia	4 (5,7%)
Otros síntomas: 3 pacientes (2%)	
Cefalea	1 (1,4%)
Epilepsia	1 (1,4%)
Artralgias	1 (1,4%)

De acuerdo con la clase funcional basada en la escala NYHA (Tabla 6), la mayoría de los pacientes (98,6%) mostraron ausencia de limitación de la actividad física, al no referir fatiga, palpitaciones o dolor tipo anginoso. Solo dos casos (1,4%) explicaron discreta limitación en sus actividades, recuperándose completamente con el reposo y ninguno presentó el grado más alto de la escala funcional en la clasificación NYHA.

Tabla 6: Clase funcional basada en la escala NYHA, de nuestro grupo de pacientes.

Clasificación NYHA	
NYHA I	145 (98,6%)
NYHA II	2 (1,4%)
NYHA III	0
NYHA IV	0

NYHA I: No limitación de la actividad física. NYHA II: Ligera limitación de la actividad física. NYHA III: Marcada limitación de la actividad física. NYHA IV: Incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin discomfort.

La Tabla 7 muestra los resultados de la clasificación Kuschnir en la que se valora los resultados obtenidos de las diferentes pruebas cardiológicas. Como ya explicamos previamente, el estadio 0 hace referencia a aquellos pacientes que se mantienen asintomáticos con el electrocardiograma y la radiografía de tórax normal. El estadio 1, incluye a aquellos que exclusivamente presentan alguna alteración electrocardiográfica con una clase funcional NYHA I. El estadio 2, agrupa a los pacientes con alguna alteración en el ECG junto con cardiomegalia observada en la radiografía de tórax, y a pesar de ello se encuentran asintomáticos. Y por el último el estadio 3, que incluye a aquellos pacientes que además de presentar alteraciones en estas dos pruebas complementarias, con cardiomegalia en la radiografía de tórax, presentan síntomas sugestivos de insuficiencia cardíaca.

Tabla 7: Escala Kuschnir en nuestro grupo de pacientes.

Clasificación Kuschnir	
Estadio 0	64 (70,8%)
Estadio 1	37 (25,7%)
Estadio 2	4 (2,8%)
Estadio 3	1 (0,7%)

ECG: Electrocardiograma. Estadio 0: ECG y rx tórax normal, sin sintomatología asociada. Estadio 1: Alteraciones ECG y NYHA I. Estadio 2: Alteraciones ECG, cardiomegalia moderada en radiografía de tórax sin signos de insuficiencia cardíaca y NYHA I. Estadio 3: Alteraciones ECG, cardiomegalia severa y signos compatibles con insuficiencia cardíaca y/o NYHA>I.

La mayoría de los pacientes [101p (96,5%)] se agruparon en los estadios 0 y 1. Sólo 4p de los 105 que se sometieron a una radiografía de tórax presentaban un índice cardiorádico aumentado.

Por otro lado, nuestros pacientes se clasificaron en cuatro grupos teniendo en cuenta el ECG, la RMN cardíaca y los hallazgos ecocardiográficos utilizando una adaptación de la Clasificación Echostage. En dicha clasificación el grupo 1 pertenecía a aquellos que tenían las tres pruebas previamente mencionadas normales, el grupo 2 presentaba alteraciones en el ECG con ecocardiograma y RMN normal, el grupo 3 tenían un ecocardiograma patológico con una RMN sin hallazgos, y el grupo 4 se refiere a aquellos pacientes que mostraban una RMN alterada independientemente de los resultados de las dos pruebas anteriores.

Tabla 8: Adaptación clasificación Echostage.

Clasificación Echostage	
Grupo 1	94 (63,9%)
Grupo 2	20 (13,6%)
Grupo 3	19 (12,9%)
Grupo 4	14 (9,5%)

ECG: Electrocardiograma. RMN: Resonancia magnética nuclear. Grupo 1: ECG, ecocardiografía y RMN normal. Grupo 2: Anomalías ECG, con ecocardiografía y RMN normal. Grupo 3: Anomalías ecocardiográficas con RMN normal. Grupo 4: Anomalías en RMN independientemente de ECG y ecocardiograma.

Sólo dos pacientes (1,4%) sufrieron infarto agudo de miocardio (IAM), presentando uno de ellos disección de aorta y requiriendo de forma inmediata revascularización coronaria, sustitución de la válvula aórtica e implantación de prótesis endovascular en cayado ascendente. Cuatro pacientes (2,7%) eran portadores de marcapasos y uno (0,7%) de un desfibrilador automático implantable (DAI).

4.1.3 Pruebas cardiológicas

De los 125 pacientes (85%) a los que se les realizó electrocardiograma, 43p (34,4%) presentaron alguna alteración. Las alteraciones más comunes detectadas en el electrocardiograma fueron las siguientes:

Tabla 9: Alteraciones electrocardiográficas.

Electrocardiograma	
Eje izquierdo	15 (12%)
Bradicardia	11 (8,8%)
Bloqueo de rama derecha	7 (5,6%)
Alteración del ST/T	7 (5,6%)
Hemibloqueo anterior izquierdo	7 (5,6%)
Ondas Q patológicas	4 (3,2%)
Bloqueo AV 1 grado	2 (1,6%)
Ritmo marcapasos	2 (1,6%)
Voltajes disminuidos	1 (0,8%)
Bloqueo AV 2:1	1 (0,8%)
Bloqueo de rama izquierda	1 (0,8%)
Taquicardia sinusal	1 (0,8%)

AV: auriculoventricular

Las alteraciones más frecuentes fueron desviación del eje cardíaco a la izquierda (15p) y bradicardia sinusal (11p). En 7 pacientes se detectó bloqueo de rama derecha, alteraciones del ST/T o hemibloqueo anterior izquierdo. Ninguno de nuestros pacientes presentó hallazgos compatibles con hemibloqueo posterior izquierdo, bloqueo AV mobitz 1 o 2, bloqueo AV completo o taquiarritmia como por ejemplo fibrilación o flutter auricular.

En 109 pacientes se midió el intervalo PR (media \pm DE; 151,67 \pm 21,38, mediana 151), y el intervalo QTc (423,84 \pm 24,42, mediana 420).

Las figuras 25 y 26 muestran ejemplos de las alteraciones electrocardiográficas detectadas en nuestra cohorte:

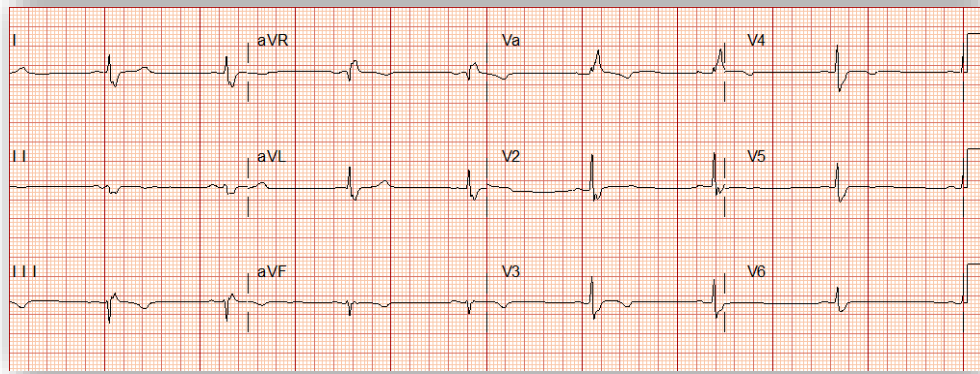


Figura 25: Alteraciones electrocardiográficas. Bradicardia sinusal, bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior izquierdo.

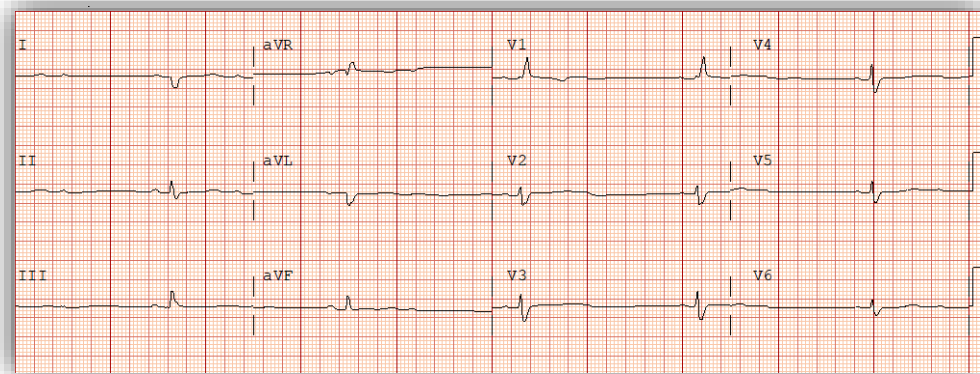


Figura 26: Alteraciones electrocardiográficas. Bloqueo auriculoventricular 2:1, bloqueo de rama derecha y hemibloqueo posterior izquierdo.

La Tabla 10 muestra las diferentes alteraciones electrocardiográficas teniendo en cuenta el momento de realización del ECG, antes o después del tratamiento:

Tabla 10: Alteraciones ECG según el momento de realización.

ECG	PRE-TRATAMIENTO (110p) 42 alterados/70 normales (60% alterados)	POST-TRATAMIENTO (51p) 22 alterados/29 normales (75,9% alterados)
BRD	6 (5,5%)	4 (7,8%)
BRI	1 (0,9%)	0
HAI	5 (4,5%)	3 (5,9%)
Bloqueo AV 1 grado	2 (1,8%)	0
Bloqueo AV 2:1	1 (0,9%)	0
Ondas Q	3 (2,7%)	1 (2%)
Alteración ST/T	4 (2,7%)	3 (5,9%)
Bajo voltaje	1 (0,9%)	1(2%)
Eje izquierdo	11 (10%)	3 (5,9%)
Repolarización precoz	8 (7,3%)	4 (7,8%)
Bradicardia	8 (7,3%)	5 (9,8%)
Taquicardia	1 (0,9%)	0
Ritmo de marcapasos	0	2 (3,9%)

ECG: Electrocardiograma. BRD: Bloqueo rama derecha. BRI: Bloqueo rama izquierda. HAI: Hemibloqueo anterior izquierdo. AV: Auriculoventricular. P: pacientes.

Al valorar los 36 pacientes a los que se les realizó ECG en pre-tratamiento y post-tratamiento, se encontraron diferencias en 9 de ellos. Dos pacientes que tenían un bloqueo

AV 2:1 y uno con bradicardia con desviación del eje hacia la izquierda pasaron a tener un ECG compatible con ritmo de marcapasos tras el implante de este dispositivo al presentar síntomas cardiológicos. Tres pacientes progresaron a bradicardia sinusal y alteración del ST/T siendo sus ECG previos normales. En tres pacientes que partían de una repolarización precoz, normalizaron su ECG tras recibir tratamiento antiparasitario. Y por último un paciente con bloqueo AV de primer grado pasó a tener un ECG con ondas Q patológicas. Todos estos resultados, en los que se observa una evolución desfavorable del ECG tras haber recibido tratamiento en comparación con su ECG basal, son estadísticamente significativos ($p<0,05$).

La Tabla 11 muestra las alteraciones ecocardiográficas encontradas en los 116 pacientes (79%) a los que se les realizó esta prueba. En 19 pacientes (12,9%) se encontró alguna alteración valvular, siendo la más frecuente la insuficiencia mitral y tricuspídea leve [13p (4,1%)], seguida por la insuficiencia aórtica en 4p (2,7%) y la estenosis e insuficiencia aórtica sólo vista en 1 paciente (0,7%). En ningún caso se detectó derrame pleural como hallazgo ecocardiográfico, ni alteraciones segmentarias de la contractilidad.

Tabla 11: Alteraciones ecocardiográficas.

Ecocardiograma	
Normal	88 (75,9%)
Alterado	28 (24,1%)
Valvulopatía	19 (16,4%)
Alteración de la relajación	14 (12,1%)
Dilatación cavidades	9 (7,8%)
Hipocinesia	6 (5,2%)
Aneurisma	1 (0,9%)

Otros valores que se tuvieron en cuenta con respecto al ecocardiograma fueron; la FEVI (fracción eyección ventrículo izquierdo) registrada en 117 pacientes, de los cuales 101 (86,3%) tenían $\geq 60\%$ y 16p tenían un valor alterado (menor de 60%) es decir el 13,7%.

La media en milímetros de diámetro del ventrículo derecho (visto en un plano de 4 cámaras) fue de 31,8mm (+/- 4,9) cuyo valor normal es <42mm, y la media de diámetro de ventrículo izquierdo fue de 43,8 (+/- 5,2) cuyos valores normales se encuentran entre 36 y 54mm.

A continuación, se describen las diferentes alteraciones ecocardiográficas teniendo en cuenta su momento de realización, antes o después del tratamiento:

Tabla 12: Alteraciones ecocardiográficas previas y posteriores al tratamiento.

Ecocardiograma	PRE-TRATAMIENTO (103 pacientes) 17 alterados/86 normales (19,8% alterados)	POST-TRATAMIENTO (45 pacientes) 11 alterados/34 normales (32,4% alterados)
Aneurisma	1 (1%)	0
Hipocinesia/alteración segmentaria	6 (5,8%)	5 (11,1%)
Dilatación cavidades	4 (3,9%)	5 (11,1%)
Alteración relajación/disfunción diastólica	9 (8,7%)	3 (6,7%)

Al comparar los resultados de los 31 pacientes, que habían sido sometidos a esta prueba tanto antes como después del tratamiento, se observó en un único caso resolución de los hallazgos de alteración de la relajación objetivada en el ecocardiograma basal. Por el contrario, se hallaron seis pacientes con progresión ecocardiográfica negativa si comparamos los ecocardiogramas realizados en diferentes momentos de la enfermedad. En concreto, cuatro pacientes sin alteraciones en el ecocardiograma basal presentaron dilatación de cavidades en la segunda prueba, un paciente con alteración de la relajación evolucionó a hipocinesia y un paciente sin hallazgos patológicos progresó a alteración de la relajación. Todos estos resultados, en los que se observa una evolución desfavorable del ecocardiograma tras haber recibido tratamiento, son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabla 13: Resultados del Holter 24 horas.

Holter 45p (30,6%)	
Frecuencia cardiaca (lpm)	74,41
Extrasístoles auriculares	25
Extrasístoles ventriculares	0
Extrasístoles A y V	17
Bloqueo AV 2:1	1

Lpm: latidos por minuto. A: Auriculares. V: Ventriculares. AV: auriculoventricular. P: pacientes.

La media de extrasístoles auriculares registrada en estos pacientes durante 24 horas fue de 194, y 787,53 en el caso de las extrasístoles ventriculares aisladas.

Tabla 14: Comparación entre los hallazgos alterados de las pruebas cardíacas y los síntomas del paciente.

Pruebas cardiológicas	Síntomas cardíacos	No síntomas cardíacos	Valor p
ECG alterado	13	30	0,406
	Síntomas cardíacos	No síntomas cardíacos	
Ecocardiograma alterado	11	17	0,088
	Síntomas cardíacos	No síntomas cardíacos	
RMN cardíaca alterada	5	9	0,519

RMN: Resonancia magnética nuclear. ECG: Electrocardiograma.

Durante la anamnesis dirigida en la consulta, se detectaron síntomas cardiológicos en 36 pacientes. De los 43 pacientes que presentaban alteraciones electrocardiográficas, 13 (30,2%) manifestaban síntomas cardíacos. Con respecto al ecocardiograma, 17p (60,7%) resultaban tener hallazgos patológicos en el ecocardiograma a pesar de no contar síntomas cardíacos en la consulta. Y en relación a los pacientes que tuvieron una RMN cardíaca alterada durante el seguimiento, nueve pacientes (64,3%) se mantenían asintomáticos a pesar de mostrar resultados anormales en el informe de dicha prueba y cinco (35,7%) referían algún síntoma cardíaco, no obteniendo en ningún caso una p estadísticamente significativa.

Tabla 15: Comparación entre los hallazgos alterados de las pruebas cardíacas y la edad del paciente.

PRUEBAS CARDIOLÓGICAS	Edad		Valor p
	< 50	≥ 50	
ECG alterado	17	26	<0,05
Ecocardiograma alterado	10	18	<0,05
RMN cardíaca alterada	6	8	<0,05

RMN: Resonancia magnética nuclear. ECG: Electrocardiograma.

De los 43p (60,5%) que presentaban alguna alteración en el electrocardiograma, 26 (60%) tenían 50 años o más, independientemente de si el ECG era previo o posterior al tratamiento, y 17p (40%) eran menores de 50 años ($p < 0.05$). Con respecto a los pacientes que presentaban un ecocardiograma alterado (28p), se observó que un 64,3% tenían 50 años o más en comparación con un 35,7% que pertenecían al grupo más joven (<50 años). Si esto lo analizamos con la RMN cardíaca, se vio que ocho pacientes (57,1%) pertenecían al grupo de ≥ 50 años y seis (42,9%) al grupo más joven. Todos estos datos resultaron ser estadísticamente significativos, lo que nos indica que los pacientes ≥ 50 años tenían más probabilidad de presentar una prueba cardíaca (ECG, ecocardiograma o RMN) alterada.

Como estudio complementario y con el propósito de estudiar específicamente el miocardio y las alteraciones producidas por la enfermedad de Chagas, se amplió el estudio cardíológico con RMN cardíaca a 52 pacientes (35,4%), de los cuales 14 (26,9%) presentaban alguna alteración y 38 (73,1%) resultaron ser normales. En concreto 26 RMN se realizaron antes de administrar el tratamiento indicado para la enfermedad de Chagas y 30 posteriormente a este.

Las alteraciones más frecuentemente observadas en la RMN cardíaca (Figura 27) fueron hipocinesia global o segmentaria con disminución de la FEVI, dilatación de cavidades principalmente en aurícula y ventrículo izquierdo, y retención patológica de gadolinio con realce miocárdico sugestiva de fibrosis cardíaca. Estas tres alteraciones se detectaron en la misma proporción [4p (28,6%)] y debemos tener en cuenta que dos de los pacientes que presentaban retención patológica del contraste se describía como posible artefacto o episodio de miocarditis previo.

Otras alteraciones descritas en la RMN cardíaca fueron la presencia de aneurisma apical observada en un paciente y signos de hipertrabeculación o hipertrofia septal objetivada en tres pacientes.

Como curiosidad y de manera indirecta se visualizaron en dicha prueba dilataciones esofágicas relacionadas con la afectación digestiva.

Varias de estas alteraciones se observaron en un mismo paciente. Uno de ellos presentó todos estos hallazgos secundarios a la enfermedad de Chagas en estadio crónico: dilatación de aurícula y ventrículo izquierdo, hipocinesia global y acinesia apical con disfunción ventricular (FEVI 36%), aneurisma apical y realce patológico de gadolinio secundario a fibrosis miocárdica. Otro de nuestros pacientes presentaba hipoquinesia de pared inferolateral en segmentos medios y distales así como del ápex (FEVI: 52%), correspondiéndose con las áreas de retención miocárdica patológica de gadolinio de afectación subepicárdica hasta transmural, compatible con la sospecha clínica de enfermedad de Chagas cardíaca.

Cuatro pacientes se realizaron la RMN cardíaca antes y después a la administración de tratamiento con el fin de seguir su evolución y observar posibles cambios; Tres pacientes no presentaron ningún cambio en la RMN cardíaca a pesar de realizarse en diferentes momentos de la enfermedad, y solo en un caso se observó discordancia entre ambas RMN describiendo resolución completa de la retención miocárdica de contraste.

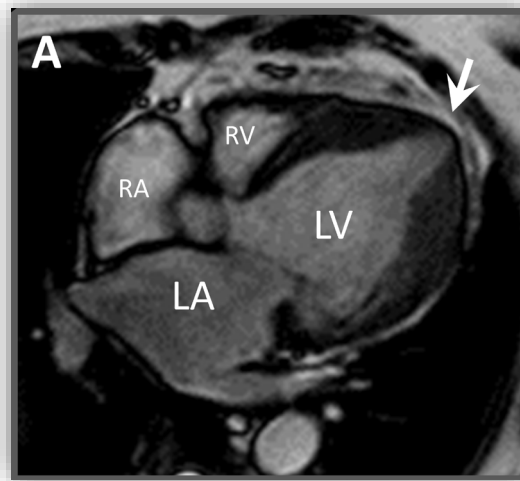


Figura 27, A: RMN cardiaca. Secuencia de cine estática. Aneurisma apical en VI. Plano cuatro cámaras. RA: Aurícula derecha, LA: Aurícula izquierda, RV: Ventriculo derecho, LV: Ventriculo izquierdo.

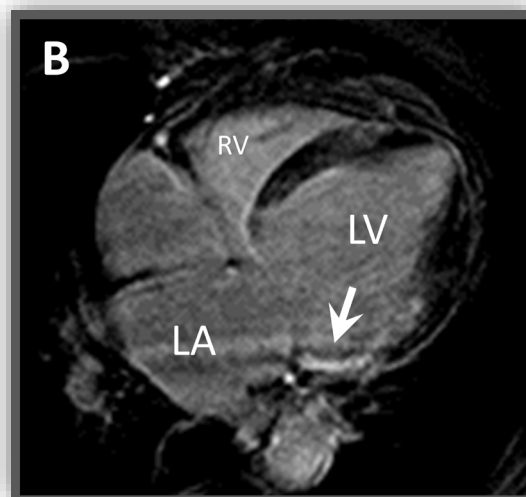


Figura 27, B: RMN cardiaca. Secuencia de contraste tardío. Realce de contraste segmento basal inferolateral. Plano cuatro cámaras.

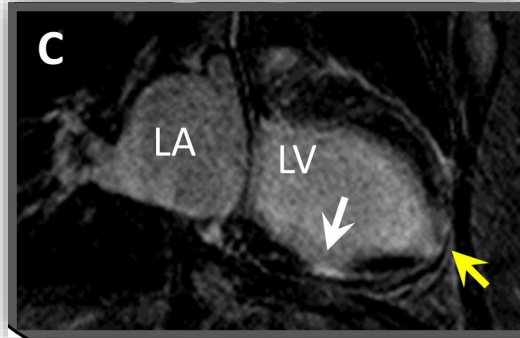


Figura 27, C: RMN cardiaca. Secuencia de contraste tardío. Realce de contraste en segmento medio de la cara inferior. Flecha amarilla: aneurisma apical con realce. Plano dos cámaras.

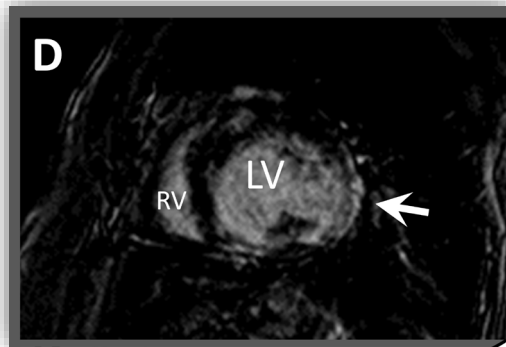


Figura 27, D: RMN cardiaca. Secuencia de contraste tardío. Realce de contraste. Eje corto.

La Tabla 16, compara los resultados de la RMN cardiaca con las otras dos pruebas cardiológicas (ECG y ecocardiograma TT) más frecuentemente realizadas en el estudio cardiológico para la enfermedad de Chagas:

Tabla 16: Comparativa de las pruebas cardiológicas realizadas.

PRUEBAS CARDIOLÓGICAS		RMN cardiaca		Valor p
		Alterada	Normal	
ECG	Alterado	10	11	<0,05
	Normal	4	27	
Total		14	38	
Ecocardiograma	Alterado	9	4	<0,05
	Normal	5	34	
Total		14	38	

RMN: Resonancia magnética nuclear. ECG: Electrocardiograma.

Un 8,7% ($p<0,05$) de los pacientes, presentaron alteraciones en el ecocardiograma a pesar de haber tenido previamente un ECG sin alteraciones.

Se encontraron diferencias en la detección de alteraciones en los pacientes a los que se les realizó ECG y RMN. Cuatro (12,9%) ECG descritos como normales resultaron tener una RMN cardiaca patológica y 11 (52,4%) en los que se describían alguna alteración presentaban una resonancia cardiaca anodina ($p<0,05$).

Algo similar ocurrió al comparar el ecocardiograma con la RMN cardiaca. Un total de cuatro pacientes (30,8%) resultaban tener alteraciones en el ecocardiograma que no se observaron en una resonancia posterior. Por el contrario, cinco pacientes (12,8%) que sí presentaron un ecocardiograma normal mostraban hallazgos patológicos significativos en la RMN cardiaca, siendo ambos resultados estadísticamente significativos con una $p<0,05$.

El análisis de pacientes asintomáticos con un ECG normal mostró que un 5,3% presentaban un ecocardiograma transtorácico alterado ($p<0,001$), a diferencia de un

27,8% con respecto al grupo que si presentaba ya alguna alteración electrocardiográfica. Con respecto a la RMN cardiaca, un 8,3% de los que referían estar asintomáticos con un ECG y un ecocardiograma normal terminaban mostrando una resonancia cardiaca patológica, en contra de un 91,7% que no presentaban ninguna alteración no resultando estadísticamente significativa dicha asociación ($p=0.144$).

4.1.4 Pruebas digestivas

Durante el estudio de nuestra muestra y en función de los síntomas que referían, se realizaron las siguientes pruebas complementarias para descartar posibles alteraciones a nivel gastrointestinal:

Tabla 17: Resultados de las pruebas digestivas realizadas.

Tránsito esofagogastroduodenal: 45p (30,6%)	
Alterados	7 (15,6%)
Reflujo gastroesofágico	5
Dilatación esofágica	2
Manometría esofágica: 14p (9,5%)	
Alterados	7 (50%)
Hipoperistaltismo	5
Acalasia	2
Enema de bario: 17p (11,6%)	
Alterados	0

P: pacientes

De los 45 pacientes que se realizaron un tránsito esofagogastroduodenal, siete presentaron alteraciones (15,6%), concretamente reflujo gastroesofágico en cinco pacientes y dilatación esofágica en dos (Figura 28 y 29).

Con respecto a la manometría se describen alteraciones en un 50% de los casos predominando el hipoperistaltismo frente a la acalasia siendo esta última un hallazgo más severo. En estos casos la manometría se describe como, “esfínter esofágico inferior de tono aumentado con ausencia de relajación y pérdida del peristaltismo compatible con acalasia”.

Por el contrario, ningún paciente presentó alteraciones en la prueba del enema de bario.

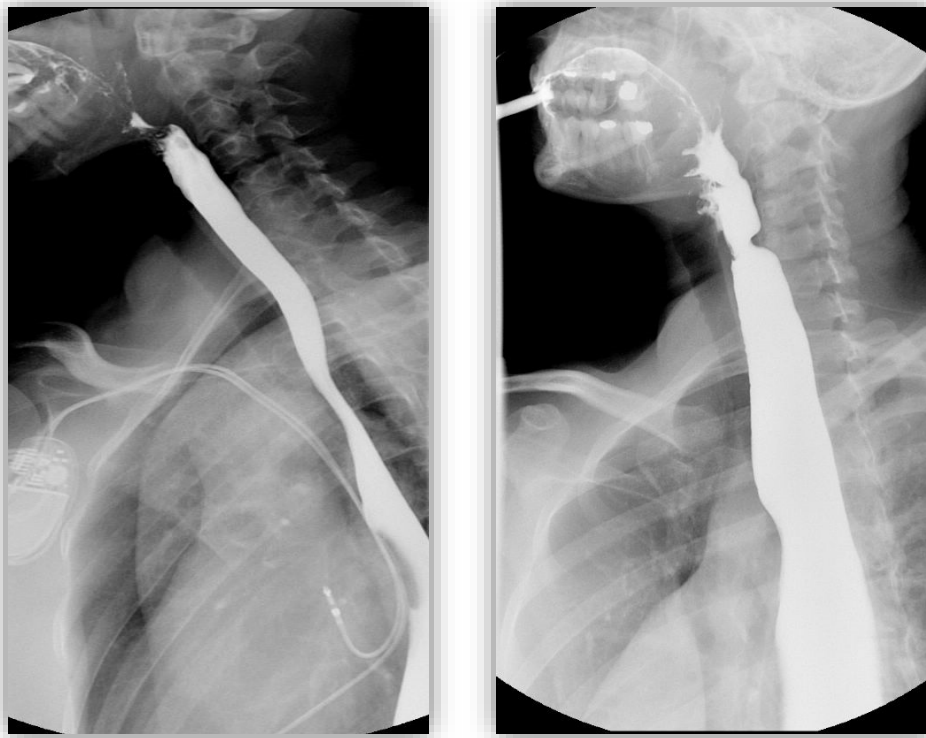


Figura 28: Tránsito esofagogastroduodenal normal (imagen izquierda) y dilatación esofágica (imagen derecha).



Figura 29: Tránsito esofagogastroduodenal normal (imagen izquierda) y dilatación esofágica proximal con estenosis distal en punta de lápiz compatible con acalasia (imagen derecha).

La Tabla 18 muestra los resultados de las diferentes pruebas gastrointestinales en relación a aquellos pacientes que referían síntomas en la consulta.

Tabla 18: Asociación de los síntomas digestivos referidos por los pacientes con los resultados obtenidos.

PRUEBAS DIGESTIVAS Y SÍNTOMAS		Síntomas		Valor p
		Si	No	
Tránsito EGD	Normal	6	32	p>0,05
	Alterado	1	6	
Enema	Normal	4	13	p>0,05
	Alterado	0	0	
Manometría	Normal	2	5	p>0,05
	Alterado	2	5	

EGD: esofagogastroduodenal.

4.1.5 Pruebas de diagnóstico microbiológico

En 78 pacientes (53,1%) se obtuvo un resultado positivo para las técnicas serológicas de ELISA e inmunocromatografía, mientras que 34p (23,2%) mostraron un sólo test serológico positivo.

Tabla 19: Resultados de las pruebas serológicas realizadas.

TÉCNICAS SEROLÓGICAS	Nº pacientes
ELISA + Inmunocromatografía	78 (53,1%)
Quimioluminiscencia + inmunocromatografía	13 (8,8%)
ELISA + quimioluminiscencia	22 (15%)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Se realizó PCR en 125 (85%) pacientes de los 147 pacientes incluidos en el estudio. De los 105 pacientes (71,4%) a los que se les realizó dicha determinación antes de recibir el tratamiento, se obtuvo un resultado positivo en 25 (17%). Posteriormente a la terapia indicada, se realizó la PCR en 73 pacientes (49,7%) resultando negativa en todos los casos. La Tabla 20 muestra que de los 73 pacientes a los que se le realizó la PCR posterior al tratamiento, 20 (27,4%) tenían previamente una PCR positiva negativizándose en el 100% de los casos ($p < 0,05$).

Tabla 20: Resultados PCR.

PCR		Post-tratamiento		
		Negativa	No realizada	Total
Pre-tratamiento	Positiva	20	5	25
	Negativa	33	47	80
	No realizada	20	22	42
	Total	73	74	147

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

4.1.6 Tratamiento

En la Tabla 21, se describe el tratamiento administrado en nuestro grupo de pacientes y sus efectos secundarios. De los 99 pacientes (67,3%) que recibieron tratamiento, 36 (24,5%) presentaron síntomas asociados a la administración del mismo. Todos los efectos secundarios se asociaron al uso de benznidazol, administrado en la mayoría de los casos, apareciendo tras el inicio de éste y durante las primeras semanas de tratamiento. Únicamente un caso que presentó exantema se atribuyó al uso de nifurtimox, y otro con cuadro de mialgias había recibido ambos tratamientos. El efecto adverso más común fue el exantema (Figura 30) en un 61,1% de los casos con respecto al grupo que presentó alguna reacción adversa. La duración media del tratamiento fue 35,6 días \pm 28,25 (mediana 60).

Tabla 21: Fármacos empleados en nuestra serie de pacientes y sus efectos secundarios.

Tratamiento/ Efectos secundarios	Benznidazol 96p (97%)	Nifurtimox 1p (1%)	Benznidazol y Nifurtimox 2p (2%)	Total
Exantema	21	1	0	22 (61,1%)
Náuseas	5	0	0	5 (13,9%)
Polineuropatía distal	2	0	0	2 (5,6%)
Artralgias	2	0	0	2 (5,6%)
Hipertransaminasemia	2	0	0	2 (5,6%)
Mialgias	0	0	1	1 (2,8%)
Astenia	1	0	0	1 (2,8%)
Cefalea	1	0	0	1 (2,8%)

P: pacientes



Figura 30: Rash cutáneo como efecto adverso al tratamiento con benznidazol.

4.2 TRABAJO EXPERIMENTAL

4.2.1. Resultados ensayos de actividad “in vitro”

Los ensayos de actividad “in vitro” frente a *T. cruzi* cepa CL B5 *lacZ*, fueron realizados de acuerdo con un protocolo secuencial en el que se evaluó la actividad del corticoide (metilprednisolona) y el benznidazol (fármaco de referencia) frente a epimastigotes (forma extracelular del parásito en el insecto vector), la citotoxicidad inespecífica sobre fibroblastos murinos L929 (células hospedadoras del parásito) y actividad frente a amastigotes (forma intracelular del parásito).

4.2.1.1. Actividad “in vitro” sobre epimastigotes

Los resultados obtenidos fueron la media de tres experimentos realizados de forma independiente, y las concentraciones de MPRD empleadas “in vitro” fueron lo más parecidas a las obtenidas a nivel plasmático en un adulto estándar. Los resultados de actividad para cada compuesto se expresaron como el porcentaje de actividad frente a epimastigotes (%AE) y como la concentración que inhibe al 50% el crecimiento de epimastigotes (CI₅₀). Para la correcta comparación de la actividad de ambos fármacos se muestran todas las concentraciones en µg/ml.

La actividad “in vitro” de estos dos fármacos frente a epimastigotes se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 22: Actividad de la MPRD y el BZ en epimastigotes, expresada como porcentaje de actividad (%AE) a las seis concentraciones ensayadas.

Concentración BZ	%AE (media±DS)	Concentración MPRD	%AE (media±DS)
66,62 µg/ml	85,73±1,89	2,128 µg/ml	4,17±4,12
33,31 µg/ml	83,65±1,27	1,064 µg/ml	4,22±4,25
16,66 µg/ml	77,22±4,44	0,532 µg/ml	4,31±4,51
8,33 µg/ml	64,79±6,76	0,266 µg/ml	1,67±2,55
4,16 µg/ml	47,55±11,31	0,133 µg/ml	4,61±4,03
2,08 µg/ml	25,57±7,56	0,0665 µg/ml	4,20±5,34

BZ: Benznidazol. MPRD: Metilprednisolona. %AE: porcentaje de actividad en epimastigotes. DS: Desviación estándar. µg: microgramo. ml: mililitro. Los resultados obtenidos son la media de los tres experimentos realizados de forma independiente, y su actividad se expresa como la media ± DS (n=3).

Cabe destacar que ninguna concentración ensayada de corticoide presenta actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi*, manteniéndose la media por debajo del 4,61%, a diferencia del BZ que supera el 25% en todas las concentraciones estudiadas (%AE > 25% a 2,08 µg/ml).

La CI_{50} del BZ fue $5,62 \pm 1,05$ µg/ml ($CI_{50} = 21,60 \pm 4,07$ µM), mientras que la CI_{50} de la MPRD se encontraba por encima de 2,128 µg/ml, de forma que no se alcanzó a pesar de haber experimentado con la concentración más alta de corticoide. En todas las concentraciones, la desviación estándar determinada fue inferior al 11,31%.

4.2.1.2 Resultados pruebas de citotoxicidad inespecífica

Se determinó la citotoxicidad de la MPRD y del BZ como fármaco de referencia tras 72 h de incubación con fibroblastos murinos L929. Los resultados de citotoxicidad inespecífica obtenidos con estos dos fármacos se recogen en la Tabla 23.

Tabla 23: Citotoxicidad frente a fibroblastos L929 a las seis concentraciones ensayadas de MPRD y BZ.

Concentración BZ	%C (media±DS)	Concentración MPRD	%C (media±DS)
66,62 µg/ml	11,50±19,92	2,128 µg/ml	19,34±16,90
33,31 µg/ml	18,85±16,70	1,064 µg/ml	18,27±16,82
16,66 µg/ml	14,87±3,57	0,532 µg/ml	17,30±3
8,33 µg/ml	13,65±5,73	0,266 µg/ml	16,65±20,12
4,16 µg/ml	14,58±3,19	0,133 µg/ml	19,62±18,94
2,08 µg/ml	10,97±2,94	0,0665 µg/ml	2,77±3,51

BZ: Benznidazol. MPRD: Metilprednisolona. %C: porcentaje citotoxicidad. DS: Desviación estándar. µg: microgramo. ml: mililitro. Los resultados obtenidos son la media de los tres experimentos realizados de forma independiente, y su citotoxicidad se expresa como la media ± DS (n=3).

Los resultados mostraron una baja citotoxicidad inespecífica en todas las concentraciones probadas tanto en la MPRD como en el BZ, lo que deja en evidencia la ausencia de toxicidad sobre fibroblastos L929. La CL₅₀ no se obtiene inclusive en la máxima concentración de corticoide probada (CL₅₀ > 2,128 µg/ml) como se muestra en los resultados de la Tabla 23 y representada en la Figura 31.

En la Figura 31, se aprecia un cambio en la coloración de azul a rosa y cuya intensidad de fluorescencia va a depender de forma directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

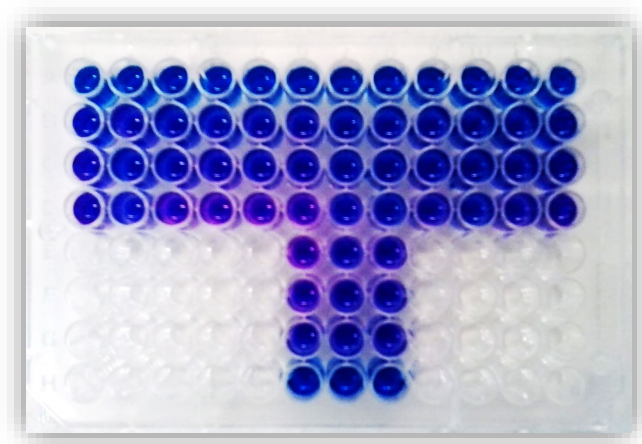


Figura 31: Ejemplo de un ensayo de citotoxicidad inespecífica de MPRD y BZ sobre células de mamífero.

4.2.1.3 Actividad “in vitro” sobre amastigotes (forma intracelular)

Los resultados de actividad “in vitro” de estos dos fármacos frente a cultivos de amastigotes se recogen en la Tabla 24.

Tabla 24: Actividad de la MPRD y del BZ en amastigotes, expresada como porcentaje de actividad (%AA) a las concentraciones ensayadas.

Concentración BZ	%AA (media±DS)	Concentración MPRD	%AA (media±DS)
0,52 µg/ml	100 ± 0,00	2,128 µg/ml	21,88 ± 4,63
0,26 µg/ml	82,77 ± 19,77	0,532 µg/ml	12,78 ± 11,14
0,13 µg/ml	47,06 ± 9,89	0,133 µg/ml	14,92 ± 13,30

BZ: Benznidazol. MPRD: Metilprednisolona. %AA: porcentaje de actividad en amastigotes. DS: Desviación estándar. µg: microgramo. ml: mililitro. Los resultados obtenidos son la media de los tres experimentos realizados de forma independiente, y su actividad se expresa como la media ± DS (n=3).

Con respecto a las concentraciones de BZ empleadas vemos como su CI_{50} se mantiene entre 0,26 y 0,13 µg/ml, exactamente $0,14 \pm 0,05$ µg/ml ($CI_{50} = 0,57 \pm 0,18$ µM). Las

concentraciones empleadas de corticoide no muestran actividad frente a amastigotes, y si comparamos el %AA que muestran ambos fármacos a concentraciones similares (0,52 $\mu\text{g/ml}$ de BZ *versus* 0,532 $\mu\text{g/ml}$ de MPRD), vemos como el corticoide resulta inactivo frente al 100% de actividad del fármaco de referencia. En la Figura 32, se aprecia un cambio en la coloración del CPRG de amarillo a rojo pudiendo interpretarse mediante espectrofotometría y asociándose a la proporción del número de parásitos vivos. Este cambio de tonalidad se percibe a simple vista en la mitad derecha de la placa, es decir en los pocillos tratados con corticoide, y en la mitad izquierda en dirección vertical y de forma progresiva según se utilizaron concentraciones menores del BZ.



Figura 32: Ejemplo de un ensayo de actividad en amastigotes CL-B5 *lacZ* con MPRD y BZ, en presencia de CPRG.

También podemos recalcar que no se aprecia de forma indirecta ninguna citotoxicidad; a pesar de haber estado en contacto los dos fármacos (BZ y MPRD) con las células (fibroblastos) durante una semana, éstas siguen manteniendo su morfología tal y como se observó mediante microscopía.

4.2.1.4 Actividad combinada de BZ y MPD *in vitro* sobre amastigotes

Con el objetivo de comprobar la existencia de un efecto positivo en el empleo conjunto del corticoide con el BZ se realizaron ensayos de combinación con dichos fármacos. Para ello se utilizó la CI_{50} del BZ previamente determinada en el ensayo de actividad frente a amastigotes ($\text{CI}_{50} = 0,57 \pm 0,18 \mu\text{M}$) y las ya empleadas anteriormente de MPRD.

Tabla 25: Actividad combinada de MPRD y BZ en amastigotes, expresada como porcentaje de actividad (%AA) a las concentraciones ensayadas.

Concentración MPRD/BZ	%AA (media±DS)
2,128 µg/ml + CI ₅₀ BZ	31,61 ± 15,33
0,532 µg/ml + CI ₅₀ BZ	0,04 ± 0,06
0,133 µg/ml + CI ₅₀ BZ	0,27 ± 0,47

BZ: Benznidazol. MPRD: Metilprednisolona. %AA: porcentaje de actividad en amastigotes.
DS: Desviación estándar. µg: microgramo. ml: mililitro. µM: micromolar.

Como se observa en la anterior tabla, las tres combinaciones de MPRD y BZ ensayadas mostraron una %AA por debajo del 50%. Según los resultados descritos, la actividad frente a amastigotes de *T. cruzi* varía de forma significativa según la concentración de corticoide ensayada con un rango entre 31,61 ± 15,33% y 0,04 ± 0,06%, teniendo en cuenta que la concentración de BZ empleada se mantiene igual en las tres combinaciones de corticoide y fármaco de referencia ensayadas.

DISCUSIÓN

5- DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas continúa siendo un problema emergente en España debido al incremento evidente del flujo migratorio en los últimos años, convirtiéndose así en el segundo país no endémico con mayor número de casos después de Estados Unidos (244). Hoy en día, supone un reto la realización de guías universales y estandarizadas sobre el manejo y seguimiento de los pacientes con infección crónica por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada (245)., El objetivo principal de esta tesis fue determinar el papel de otras pruebas cardiológicas en la fase crónica de la enfermedad caracterizada por la ausencia de síntomas, y comparar su utilidad frente a las pruebas ya protocolizadas. Por otro lado, uno de los grandes inconvenientes de esta patología se debe al tratamiento y sus reacciones adversas. En concreto el benznidazol produce, en un alto porcentaje de pacientes, problemas cutáneos que impiden una adecuada adherencia, planteándose durante la práctica clínica el uso de corticoides que mejoren dichos efectos secundarios. Es por ello por lo que uno de los objetivos fue estudiar “in vitro” el efecto del uso combinado de corticoide y benznidazol frente a *Trypanosoma cruzi*.

5.1 DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

La proporción de mujeres con enfermedad de Chagas en nuestro hospital fue claramente mayor (80,3%), en concordancia con otras series procedentes de países no endémicos (244)(54)(246), a pesar de que no existen estudios donde se determine que esta enfermedad es mas prevalente en el sexo femenino. Esto en gran parte se debe a los protocolos de detección precoz que se realizan durante el embarazo tras demostrar en varios estudios observacionales que las mujeres tratadas antes de esta etapa son significativamente menos propensas a transmitir la infección a su descendencia con respecto a las mujeres no tratadas (247)(173)(53).

En nuestra serie de pacientes solo un 28,6% se diagnosticó a raíz de confirmar el embarazo y en un 96,6%, la vía de transmisión referida fue la vectorial. Esto debemos interpretarlo con cautela debido a la falta de medios y recursos que nuestros pacientes tienen en su país de origen, con dificultad para el diagnóstico certero de la vía de

transmisión, debiendo tener en cuenta otras posibles formas de contagio, como la alimentaria o vertical.

El principal país de origen de nuestros pacientes es Bolivia en un 92,5%. Un porcentaje muy lejano en relación al resto de países como Paraguay, que se mantiene en segundo lugar, seguido de Ecuador, El Salvador, Brasil y Perú, acorde con lo publicado por Requena-Méndez *et al* (53)(202)(248). Por el contrario, si buscamos esta distribución en otros estudios observamos una proporción algo menor (249)(250), pudiendo deberse a los flujos migratorios que actualmente están cambiando la distribución de la enfermedad en países endémicos y no endémicos (251)(252). La estimación del número de habitantes bolivianos en España a fecha de enero de 2018 es de 99.441 según cifras del Instituto Nacional de Estadística. Se estima, que en 2013 un total de 36,7 millones de personas emigraron de América Latina y el Caribe a diferentes lugares del mundo (251), como consecuencia de las condiciones socioeconómicas paupérrimas a las que se ven sometidos (173).

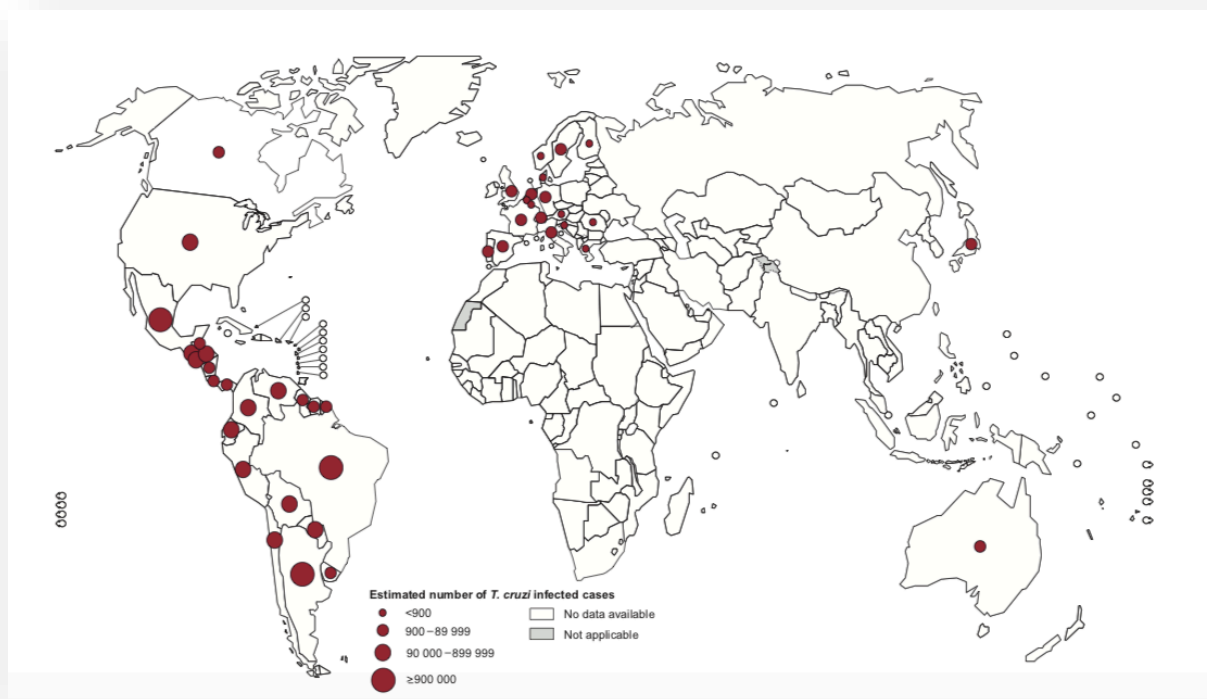


Figura 33: Distribución mundial de casos de enfermedad de Chagas, según estimaciones oficiales, 2006–2010 (253).

Se presume que la carga de enfermedad es más elevada entre los migrantes que la población general de los países endémicos, suponiendo que el idioma, la ausencia de seguro médico en algunos países, el miedo a la deportación y el estigma de la enfermedad supongan una barrera para el diagnóstico y el tratamiento; sin embargo, no se aclara ningún factor de riesgo que desencadene de forma directa dichos resultados (251)(254)(255).

En definitiva, hoy por hoy sigue siendo un reto estimar de forma óptima la prevalencia de la enfermedad de Chagas debido a la escasez de datos y las limitaciones en los estudios, al no obtener muestras adecuadamente representativas (53).

5.2 DATOS CLÍNICOS

De acuerdo con lo publicado hasta el momento por Ribeiro *et al*, un alto porcentaje de pacientes en fase crónica, en nuestro caso el 52,4%, se mantuvieron asintomáticos durante largos periodos de tiempo (256). Es evidente la ausencia de casos agudos debido al corto periodo de duración de dicha fase (en torno a 4-8 semanas) con evidencia del descenso de la parasitemia a los 90 días (12), limitando mucho más su diagnóstico si nos referimos a países no endémicos. De acuerdo con ello, nuestros pacientes pertenecían a la fase crónica en su práctica totalidad y, previsiblemente, fuimos detectando mayor número de casos nuevos por transmisión vertical al establecer protocolos dirigidos a mujeres en edad fértil.

Según revisiones recientes sobre la enfermedad de Chagas (35)(12), alrededor de un 60-70% permanecerán asintomáticos y sin afectación orgánica, es decir serologías positivas para *T. cruzi* con el resto de pruebas complementarias normales, y un 30-40% desarrollarán alguna alteración cardíaca, digestiva o de ambas en los próximos 10-30 años. En nuestro caso, un 39,5% presentaron alguna alteración hallada en las diferentes pruebas realizadas, acorde con los resultados descritos por Rassi *et al* (35).

Como consecuencia de estos periodos caracterizados por la ausencia de síntomas, existe un gran inconveniente a la hora de detectar dicha enfermedad; a ello se le suma además la

baja visibilidad dentro de nuestra población y la desinformación de los propios especialistas, provocando su infradiagnóstico.

La proporción de síntomas cardíacos fue ligeramente mayor (24,5%) frente a los digestivos, con un 21,2%, estando en consonancia con múltiples publicaciones previas (257)(120). A pesar de esto, se debe tener en cuenta la variabilidad en los datos según donde se realice el estudio, predominando casi exclusivamente la forma digestiva en el sur de la cuenca del Amazonas (Argentina, Brasil, Chile y Bolivia) (258)(35). Cabe destacar el bajo porcentaje de pacientes que presentaron síntomas neurológicos (2%), en probable relación a la escasa manifestación de esta enfermedad en el sistema nervioso, cuyos afectados principalmente son pacientes inmunodeprimidos (141)(140); o síntomas reumatológicos sin llegar a un diagnóstico fehaciente.

Centrándonos en la sintomatología cardíaca que referían los pacientes en nuestra consulta, el dolor torácico fue el síntoma más común (15,7%), a pesar de no presentar signos compatibles con fracaso cardíaco. De acuerdo con los datos aportados por estudios como Bestetti *et al.*(259), hasta el 15% de los pacientes presentan dolor opresivo centrotorácico. Atendiendo entonces a este porcentaje y aunque en muchas ocasiones el dolor era atípico e inespecífico, se debe tener en cuenta siempre por la gravedad que puede suponer (258).

Sólo un 1,4% de los pacientes sufrieron infarto agudo de miocardio requiriendo de forma inmediata revascularización coronaria, y un 3,4% se sometieron a la implantación de algún dispositivo cardíaco como DAI o marcapasos. Si bien, existen muchos ensayos que demuestran la utilidad del DAI en la taquicardia ventricular sostenida refractaria o hemodinámicamente inestable (210), no sucede lo mismo en pacientes con enfermedad de Chagas al no haber estudios donde comparen la eficacia del dispositivo en comparación con tratamiento farmacológico como la amiodarona (260).

A pesar de que la afectación digestiva suele ser menos común, como ya describen Palmezano *et al* (120)., Malik *et al* (257), y Bern *et al.* (173), el síntoma más frecuente referido por los pacientes fue el estreñimiento, obligando a descartar la presencia de

megacolon con pruebas complementarias como el enema de bario, dado que su progresión puede derivar en obstrucción intestinal por fecaloma, vólvulo o isquemia intestinal (12). Por ello, se completó el estudio sin observar ningún caso de dilatación colónica a lo que achacar dichos síntomas siendo muy difícil determinar si es debido a la propia infección o a los hábitos de vida de los pacientes. Pese a todo esto, se aconseja la realización de las pruebas pertinentes en caso de que el paciente refiera síntomas sugestivos de afectación intestinal (216), teniendo en cuenta que tanto la acalasia como el megacolon, según Bilder *et al.*, es la segunda manifestación más común en la enfermedad de Chagas en fase crónica (261).

En el periodo de tiempo que abarca nuestro estudio no se recogió ningún exitus, aunque sólo se pudo hacer un seguimiento posterior en la mitad de los pacientes por lo que no podemos descartar la pérdida de algún caso. No obstante, estos resultados estarían en escasa consonancia con la cifra de 10.000 muertes anuales por enfermedad de Chagas publicada por la OMS, u otras series publicadas que muestran un índice de mortalidad de hasta el 20% (262)(43). Debemos por tanto hacer mayor hincapié en el seguimiento de estos enfermos dado que la muerte súbita es la principal causa de muerte en pacientes con cardiopatía por enfermedad de Chagas, seguida de la insuficiencia cardiaca refractaria y tromboembolismo (110).

Resulta llamativo, la ausencia de clasificaciones cardiacas universales o estandarizadas en la enfermedad de Chagas que mejoren la comprensión de la evolución clínica y su pronóstico. En la actualidad una de las más empleadas es la escala de Rassi *et al.*, en la que se estratifica la probabilidad de riesgo de mortalidad según los siguientes factores: sexo, clase NYHA, cardiomegalia vista mediante radiografía de tórax, presencia de anomalías en el movimiento de la pared global o segmentaria observadas en ecocardiograma, taquicardia ventricular no sostenida en holter de 24 horas o voltajes disminuidos del complejo QRS en ECG (35).

Todos nuestros pacientes se incluyeron en la clase I o II de la clasificación NYHA (232), al contrario que otros estudios en los que sí se cataloga a algún paciente en la clase III (229) o clase III/IV (35). Considerando la clasificación Kuschnir (233), el estadio 0 fue el más predominante con un 70,8% seguido de un 25,7% en el estadio 2 muy similar a lo

descrito por Sánchez-Montalvá *et al.* (229). Por último y teniendo en cuenta la adaptación propia de la escala Echostage (234), en la que se añadieron los resultados de la RMN cardíaca, el 63,9% de nuestros pacientes se clasificó en el grupo I, en consonancia con lo obtenido por Sánchez-Montalvá *et al.* (229).

5.3 PRUEBAS CARDIOLÓGICAS

Debido a la variedad de pruebas complementarias para el estudio cardiológico que se utilizan actualmente (ECG, ecocardiograma TT, holter o RMN cardíaca), se pueden hallar diversas anomalías sutiles o inespecíficas en pacientes sin miocardiopatía manifiesta, desconociendo de forma precisa el valor pronóstico de estas alteraciones si hablamos de la enfermedad de Chagas (41).

Cabe destacar los elevados porcentajes de pacientes asintomáticos durante el seguimiento en consulta que presentaban pruebas complementarias con alguna alteración; en concreto, un 70% mostraban hallazgos reseñables en el electrocardiograma, un 60,7% en el ecocardiograma, y un 64,3% en la resonancia magnética cardíaca ($p>0,05$).

Esto indica, una vez más, la necesidad de ampliar el estudio con pruebas complementarias a pesar de que no exista sintomatología, pudiendo detectar en etapas tempranas de la enfermedad hallazgos de interés y más específicos de la enfermedad de Chagas, como la fibrosis miocárdica (263).

*Electrocardiograma:

El 34,4% de nuestros pacientes mostró alguna alteración electrocardiográfica, destacando la presencia de eje izquierdo (12%), bradicardia sinusal (8,8%), BRD, alteración en ST/T y HAI (5,6%). Estos porcentajes son mayores a los encontrados en otras series (54) en los que también se observa con mayor frecuencia BRD y bradicardia sinusal. Según los criterios de Dubner *et al.* (55), la miocardiopatía por Chagas se caracteriza por la presencia de alteraciones en la onda P que indiquen fibrosis del tejido auricular, HAI, BRD, presencia de onda T negativa y extrasístoles ventriculares, ocurriendo hasta en el

25% de los individuos infectados en fase crónica, siendo esta cifra algo más baja que la aportada en nuestro estudio.

Aunque no exista un patrón electrocardiográfico patognomónico, la presencia de estas alteraciones en pacientes con serología positiva se relaciona con miocardiopatía chagásica en fase crónica determinada (264)(265), y especialmente la combinación de BRD y HAI más característica en esta enfermedad (266).

El ECG ha sido el método de elección en el estudio cardiaco del paciente con infección por *T. cruzi* debido a su sencillez, bajo coste y alta sensibilidad. En múltiples estudios no se recomienda ampliar los estudios cardiológicos en pacientes asintomáticos con un electrocardiograma normal, procediendo a un seguimiento rutinario anual o bianual (55)(35)(267). Según estos autores, un ECG normal excluye la presencia de disfunción moderada o grave del VI, con un valor predictivo negativo (VPN) cercano al 100% (266). Según describen, en caso de que esta prueba sugiriera alguna alteración, estaría indicado realizar un ecocardiograma y holter de 24 horas (173)(268). Por tanto, la fase indeterminada de la infección crónica por *T. cruzi* se establece tras la obtención de resultados normales en el ECG y la ausencia de síntomas. Todo ello se opone a lo que proponen Pérez-Molina *et al.* y Gascón *et al.*, quienes aconsejan la realización de un ecocardiograma transtorácico como estudio base junto con el ECG.

Si hacemos referencia a nuestros resultados vemos que hasta un 8,7% ($p < 0,05$) presenta alteraciones en el ecocardiograma a pesar de haber tenido previamente un ECG normal, lo que justificaría la necesidad de completar el estudio con estas dos pruebas cardiológicas como indican Viotti *et al.*, con una discordancia entre ellas de un 7,8% y Carrasco *et al.* de un 17,9% (190)(269)(270).

*Ecocardiograma TT:

La principal función en el caso del ecocardiograma es determinar la forma, el tamaño y la función cardiaca, considerándose como hallazgo precoz la alteración del movimiento de la pared ventricular, o como hallazgo tardío la miocardiopatía dilatada (frecuentemente del ventrículo izquierdo) y aneurisma apical (12)(35).

El factor pronóstico con mayor relevancia en la cardiopatía chagásica es la disfunción sistólica ventricular izquierda (120)(102). El ecocardiograma transtorácico debe repetirse con cierta frecuencia dependiendo de la situación individual de cada paciente, teniendo en cuenta que no existen en la literatura estudios que se pongan de acuerdo al respecto. Ante esto, se aconseja hacer un segundo ecocardiograma a los cinco años del primero si el paciente se mantiene asintomático y a los 1-3 años si existe alguna alteración previa en su estudio cardiológico (266) con el objetivo es identificar una posible disfunción cardíaca (271). En nuestro caso solo 31 pacientes tenían hecha esta prueba en dos momentos diferentes, antes y después del tratamiento; 21 lo mantenían normal, 5 presentaban alteraciones que previamente no se habían descrito y otros 5 lo normalizaban.

El 24,1% de nuestros pacientes presentaron un ecocardiograma alterado, una cifra algo mayor que la mostrada en otros estudios (10,6%) (54), pudiendo deberse a la inclusión de todos aquellos pacientes que han presentado alguna afectación valvular. Los hallazgos que se observaron con mayor frecuencia fueron la valvulopatía mitral y tricuspídea (16,4%), sin que se asocie de forma específica a esta enfermedad según la literatura publicada; alteración de la relajación o función diastólica (12,1%) en un porcentaje mucho menor al descrito por Sánchez-Montalvá *et al.* con un 20,4% sin llegar a una fase restrictiva; dilatación de cavidades (7,8%) característicamente descrita en la miocardiopatía chagásica (266); alteración de la contractilidad (5,2%) con un resultado muy parecido a otras series españolas (54) pero inferior a la publicada por Gascón *et al.* en la que se describe como la alteración más frecuente; y aneurisma del septo interauricular vista en un solo caso (0,9%) y acorde con otros estudios aunque la localización predominante de la aneurisma sea a nivel apical (229).

La reducción de la FEVI junto con el aumento del diámetro telesistólico son los predictores ecocardiográficos más relevantes en esta patología (266). En nuestro caso, el 13,7% de la muestra presentó una FEVI < 60, el 11,1% se mantuvo con una FEVI ≤ 55, y el 2,6% fue ≤ 50, siendo estos porcentajes superponibles a los descritos por Sánchez-Montalvá *et al.* (229).

No se observaron modificaciones en los hallazgos ecocardiográficos asociables al tratamiento, al contrario de lo que se encontró para las alteraciones electrocardiográficas. Debemos interpretar con cautela estos resultados teniendo en cuenta la variación en la descripción de las características halladas en dichas pruebas, a pesar de realizarse en centros especializados (272), y con una literatura publicada hasta el momento donde ponen en tela de juicio la eficacia del tratamiento antiparasitario en aquellos individuos con cardiopatía establecida, al no demostrar una disminución en su progresión (273).

***Holter 24h:**

El holter de 24 horas sirve para la detección de posibles arritmias, siendo su corto periodo de monitorización la mayor desventaja de esta técnica, ya que su sensibilidad disminuye considerablemente en aquellos pacientes que sufren arritmias ocasionalmente (266). En cualquier caso, su realización está recomendada en aquellos pacientes que refieren síntomas como palpitaciones, síncope o presíncope, o aquellos que presenten alguna arritmia en el ECG. Sólo 45 de nuestros pacientes (30,6%) fueron sometidos a un holter de 24 horas y 17 pacientes mostraban extrasístoles auriculares (EA) y ventriculares (EV).

La presencia de extrasístoles ventriculares puede ser un signo prematuro de afección cardíaca que, sin una monitorización electrocardiográfica, puede pasar desapercibida pero que también pueden ocurrirle a personas con función ventricular conservada (35). De hecho, la población sin aparente cardiopatía estructural, presenta una incidencia de extrasístoles ventriculares en torno a un 4 y un 50% (274).

Hasta en el 90% de los pacientes con cardiopatía chagásica en los que se halla disfunción ventricular o insuficiencia cardíaca se registran episodios de taquicardia ventricular no sostenida (275). Por tanto, el holter es una prueba que puede ayudar a establecer una relación de los síntomas con la presencia de arritmias, identificando a los individuos con posible riesgo de muerte súbita, sin olvidar sus limitaciones (276)(277).

***Resonancia magnética nuclear cardíaca:**

Sabemos que la RMN es una técnica adecuada para la evaluación directa y precisa del corazón en dimensiones, contractilidad y caracterización tisular. Representa por tanto el mejor método para detectar la disfunción ventricular temprana y grado de edema o

fibrosis, suponiendo de importante valor pronóstico en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, indicándonos el avance de la enfermedad hacia la miocardiopatía crónica (278)(263).

El 27% de las RMN cardiacas realizadas en nuestro estudio mostraron alguna alteración. Sin embargo, considerando el escaso número de individuos a los que se les realizó esta prueba (35,4%) y que como criterio de inclusión únicamente se tuvo en cuenta haber tenido serología positiva para *T. cruzi*, pudo existir un sesgo de selección. Como criterios de exclusión se tuvieron en cuenta los pacientes que tenían claustrofobia o alergia al contraste, aquellos que portaban un dispositivo cardiaco y las pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.

Las alteraciones más frecuentemente descritas y con mismo porcentaje de aparición fueron: la hipocinesia global o segmentaria con descenso de la FEVI asociada (7,7%); la dilatación de cavidades (7,7%); y por último, la fibrosis cardiaca interpretada así tras comprobar retención patológica de gadolinio con realce miocárdico. Sólo en un caso se observó la presencia de aneurisma apical, no siendo descrito en el ecocardiograma previo.

Si comparamos el porcentaje de pacientes que tenían un ecocardiograma alterado (24,1%) con una RMN cardiaca alterada (27%), vemos que el porcentaje de pacientes que presentaba esta última prueba alterada era mayor. Esto puede deberse a que la RMN cardiaca tiene mayor sensibilidad detectando alteraciones diferentes en pacientes asintomáticos al tratarse de fases muy incipientes de la enfermedad (279). Acorde con lo anteriormente descrito, existen cada vez más publicaciones que demuestran una fibrosis miocárdica de bajo grado sin llegar a progresar a disfunción miocárdica perceptible en el ecocardiograma (280). En otros estudios con pacientes en fase indeterminada se encontró que un 27% presentaban realce miocárdico con retención de gadolinio de forma significativa, a diferencia de un 87% en aquellos pacientes con miocardiopatía conocida (281). Estos hallazgos se observan todavía en grados leves lo que genera desconcierto a la hora de iniciar tratamiento teniendo en cuenta la falta de eficacia de los fármacos tripanocidas.

La falta de colaboración del paciente durante los periodos de apnea necesarios para la adecuada interpretación de la RMN cardiaca puede artefactar los resultados e infraestimar la hipocinesia. También, con motivo de posibles artefactos o episodios previos de miocarditis, algunos pacientes pueden mostrar una retención de gadolinio no significativa o interpretarla de forma inadecuada.

En el presente trabajo no siempre se encontró correlación entre los hallazgos obtenidos en el ECG y el ecocardiograma con la RMN cardiaca. Cuatro de las 14 RMN alteradas tenían un ECG previsiblemente normal, pudiendo deberse a la presencia de alteraciones muy tempranas sin cambios inicialmente en el ECG, como ya describen otros estudios (282). Si comparamos los resultados obtenidos del ecocardiograma y la RMN cardiaca observamos como cinco de los 14 pacientes que tenían ambas pruebas realizadas presentaban una resonancia cardiaca patológica con un ecocardiograma normal ($p < 0,05$).

Esto concuerda con los resultados obtenidos por Torreão JA *et al.* quienes encontraron que un 12,5% de los pacientes en esta misma fase, asintomáticos, presentaban alteraciones en la RMN cardiaca a pesar de tener el resto del estudio complementario normal (ECG y ecocardiograma) (280). En nuestro caso el porcentaje fue algo menor (8,3%) con una $p = 0,144$, cuya falta de significancia estadística pudo deberse al pequeño tamaño muestral.

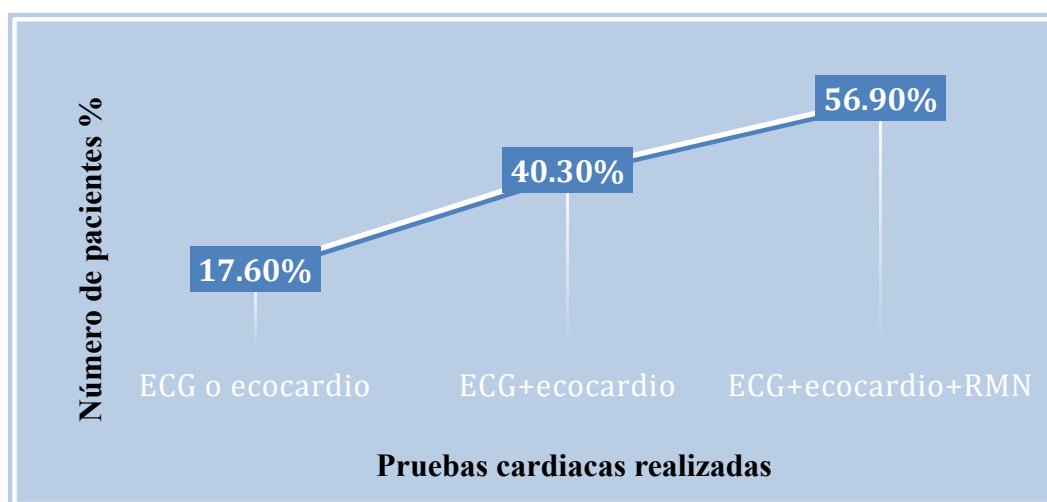


Figura 34: Representación de la progresión de afectación cardiaca según el número de pruebas realizadas.

Según nuestros resultados (Figura 34), sólo tres pacientes de 17 (17,6%) con una única prueba cardiológica realizada (ECG o ecocardiograma) presentaron alteraciones; y 25 pacientes de 62 (40,3%) con dos de estas pruebas mostraron alteraciones cardíacas. Si tenemos en cuenta los pacientes que tuvieron las tres pruebas realizadas (ECG, ecocardiograma y RMN), 29 de 51 (56,9%) tenían hallazgos patológicos que sugerían cardiopatía estructural.

Estos resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) nos indican que a medida que se realizan mayor número de pruebas cardíacas mayor es el número de pacientes con patología estructural, es decir con técnicas como el ecocardiograma o la RMN cardíaca se detectan más alteraciones que únicamente basándonos en la clínica y el ECG. Esto puede ser consecuencia de que pruebas como el ECG, el ecocardiograma y la RMN evalúan de manera paralela diferentes aspectos como por ejemplo el sistema de conducción, la función estructural y el miocardio respectivamente (251, 261) (284).

Es importante considerar que el ECG tiene baja sensibilidad para el compromiso cardíaco, y el ecocardiograma generalmente es normal en pacientes en fase indeterminada, por lo que otras pruebas como la RMN pueden detectar grados de fibrosis incipientes sin compromiso cardíaco alguno objetivado por ecocardiograma (263).

Por otro lado, nuestro análisis confirmó que la edad es un factor de riesgo para la miocardiopatía de Chagas. Los pacientes mayores de 50 años presentaron en mayor medida (60,5%, 64,3% y 57,1%) alguna alteración en las pruebas complementarias cardiológicas (ECG, ecocardiograma y RMN, respectivamente) en comparación con el otro grupo de edad (285,286)(229)(281).

Cabe destacar el papel relevante de la RMN cardíaca para conocer y prever el pronóstico de estos pacientes, tan demandado en los últimos años y actualmente medido a través de la escala Rassi *et al.* (35). En concreto, se ha demostrado que el grado de fibrosis observado en la RMN se asocia de forma directamente proporcional a la puntuación de

cada uno de los grupos de riesgo que forman esta escala. Asimismo, correlaciona de forma veraz la estimación cuantitativa de fibrosis con la FEVI (cuanto más alto sea el grado de fibrosis menor es la FEVI) y la escala NYHA (281).

A pesar de esta clara necesidad de realizar un estudio más amplio y después de más de 110 años desde el descubrimiento de la enfermedad por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1909), siguen existiendo importantes lagunas en los campos técnicos, científicos y políticos que deben superarse para hacer frente con eficacia a esta condición ampliamente descuidada.

5.4 PRUEBAS DIGESTIVAS

En nuestra serie la forma gastrointestinal fue menos frecuente (10-21%)(12) y, aunque la mortalidad es baja, la calidad de vida de estos pacientes se ve gravemente afectada (287). Las manifestaciones observadas pueden ir desde acalasia leve hasta el megaesófago grave, afectando principalmente las regiones distales como el recto o el sigma (12).

Hoy en día, se sabe que la dominancia de la forma digestiva o cardíaca está estrechamente asociada al serotipo de *T. cruzi*. Por tanto, la prevalencia de estas alteraciones va a depender del patrón de inmigración de cada país (288) como por ejemplo, los hallazgos de megaesófago o megacolon que resultan ser más comunes en el centro de Brasil (287).

Los síntomas que nos sugieren una afectación digestiva en la enfermedad de Chagas son muy inespecíficos, lo que supone un gran inconveniente a la hora de interpretarlos. Además, estos síntomas pueden deberse a múltiples factores de confusión como: Otras infecciones comunes (*Helicobacter pylori*), problemas gastrointestinales relacionados con hábitos tóxicos (consumo de alcohol, tabaco, hoja de coca) (289) (290)(291), tipo de dieta (292), grado de estrés, estilo de vida (sedentarismo), etc... A consecuencia de esto, es precisa la valoración por un médico experto en esta patología para así discernir los síntomas relevantes y la realización de las pruebas pertinentes. En nuestro caso no se

tuvieron en cuenta estos factores (dieta, hábitos de vida, consumo de tóxicos, infecciones asociadas...) por lo que no pudimos obtener resultados concluyentes.

Según la literatura hasta ahora descrita no está indicado la realización de pruebas digestivas de forma sistemática, quedando únicamente relegadas a aquellos pacientes que refieren síntomas (82). De acuerdo con esto y según los síntomas descritos, las pruebas más acordes para completar el estudio son el enema de bario, el tránsito esofagogastroduodenal (EGD) y la manometría, a pesar de no haber sido actualizadas desde hace más de 60 años (287).

En nuestro estudio observamos un porcentaje elevado de pacientes a los que se les realizó alguna prueba digestiva (transito EGD: 30,6%; manometría: 9,5%, enema de bario: 11,6%) teniendo en cuenta que sólo el 21,1% de nuestra serie refería síntomas gastrointestinales, principalmente estreñimiento y pirosis. Nuestros resultados fueron muy similares a los obtenidos por Pinazo *et al.*, con un porcentaje de afectación digestiva del 18,4%, y por otros investigadores (293)(294)(54)(173)(295), aunque a diferencia de estos no observamos ningún caso de megacolon (287).

El 15,6% de nuestros pacientes con tránsito esofagogastroduodenal, presentaron alguna alteración asociada a la enfermedad de Chagas, siendo la más frecuente el reflujo gastroesofágico (11,1%) seguido de la dilatación esofágica (4,4%). Con respecto a la manometría, sólo se realizó al 9,5% de los pacientes, de los cuales un 35,7% presentó hipoperistaltismo y un 14,3% acalasia, relacionándose con estadios más tardíos de la enfermedad.

Ninguno de nuestros pacientes presentó alteraciones en el enema opaco compatibles con la infección crónica producida por *Tripanosoma cruzi*. Esto se puede deber a que la presencia de megacolon es una manifestación tardía de la enfermedad con síntomas lentamente progresivos, a diferencia de la dilatación esofágica cuyos síntomas aparecen más rápidamente (287).

Se hizo una comparativa de todos aquellos pacientes que comentaban síntomas en la consulta con los hallazgos descritos en las pruebas, y observamos que seis de los siete pacientes (85,7%) que tenían alterado el tránsito EGD no referían síntomas acordes, y sólo un único caso (14,3%) tenía síntomas compatibles con los hallazgos que se veían en la prueba.

No se encontró asociación entre los hallazgos patológicos de la manometría y la sintomatología del paciente. En relación a estos resultados, podemos decir que todavía existe controversia con las indicaciones de la manometría de alta resolución, ya que algunos estudios aconsejan hacérsela a todo paciente con enfermedad de Chagas, independientemente de sus síntomas, tras describir afectación motora esofágica en dos tercios de la población infectada (294)(296).

Estudios recientes muestran una posible asociación entre la presencia de megaesófago y cáncer de esófago, al contrario que el megacolon que hasta el momento no parece tener asociación con el cáncer colorrectal (114). Ninguno de los pacientes de nuestra serie presentó cáncer de esófago, según los datos recogidos en su historia clínica.

5.5 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La serología es una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, pero no se ha estudiado lo suficiente como marcador de curación o progresión de la infección, puesto que la seroconversión puede tardar décadas (297).

La OMS recomienda realizar al menos dos técnicas serológicas diferentes con el fin de evitar casos no concluyentes (Figura 35). En caso de discordancia se aconseja recurrir a una tercera técnica serológica, en concreto la IFI, con una sensibilidad del 95% y especificidad del 100%. Existe un amplio número de test serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, diferenciados entre sí por el tipo de técnica o antígeno empleado como son: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemoaglutinación indirecta (HAI), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o inmunocromatografía (297). El 76,8% de nuestros pacientes presentó dos pruebas serológicas positivas, siendo las dos técnicas más utilizadas con un 53,1% la combinación de inmunocromatografía y ELISA. Un 23,2% de los pacientes presentó un único test serológico positivo que por falta de seguimiento no se

ha podido completar con una segunda serología, por lo que según las actuales recomendaciones de la OMS no serían diagnósticos de enfermedad de Chagas (297).

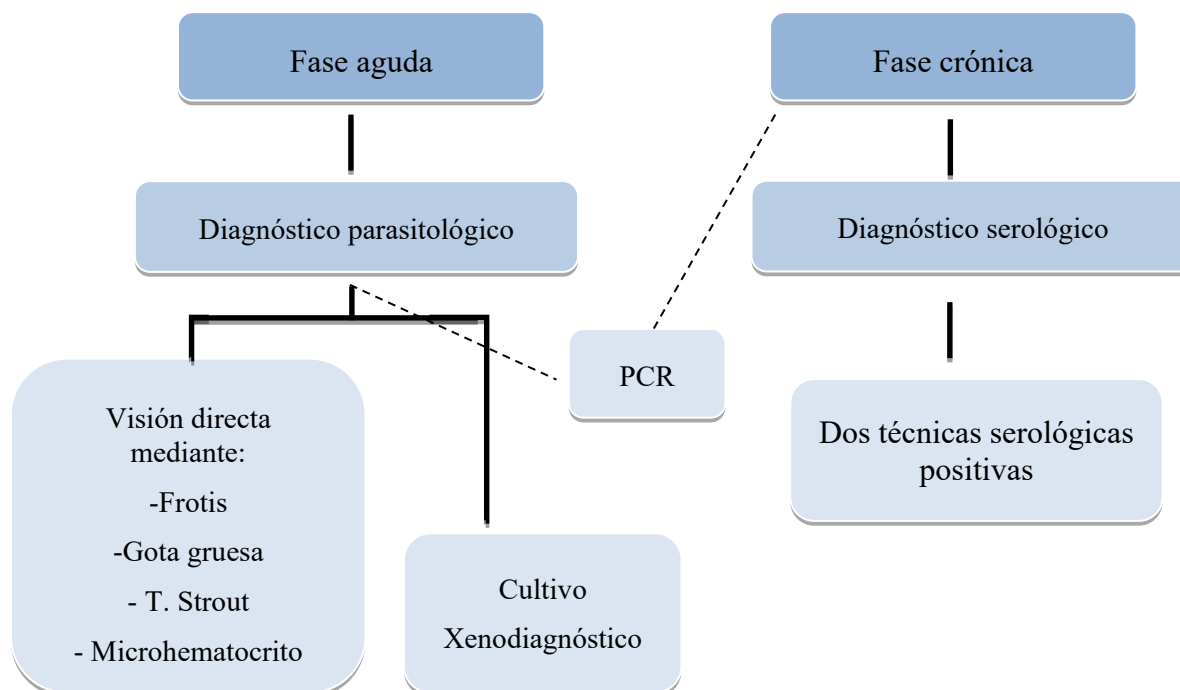


Figura 35: Diagnóstico de la enfermedad de Chagas (297).

Uno de los grandes inconvenientes en el seguimiento de los pacientes con enfermedad de Chagas es la falta de parámetros o marcadores que indiquen respuesta terapéutica temprana.

La PCR se utiliza cada vez más como una herramienta de monitorización y control de reactivación de la enfermedad (157). Su positividad se asocia con la presencia y gravedad de la miocardiopatía, lo que sugiere un papel directo de la persistencia del parásito en la patogénesis de la enfermedad (298). No obstante, un 34,3% de nuestra serie presentaba alteraciones, a pesar de un resultado negativo en la PCR, cuya sensibilidad puede depender del volumen de la muestra, del procesamiento y de la técnica empleada (156).

En nuestra serie hemos observado una negativización de la PCR posterior al tratamiento en el 100% de los casos estudiados, siendo este resultado mayor que el observado en el ensayo BENEFIT (273). No obstante, en dicho estudio se observó una tendencia a la

regresión (nueva positivización) en el seguimiento posterior, dato que no recogimos en nuestro caso por lo que no podemos obtener información concluyente.

En conclusión, hoy en día y a pesar de los múltiples métodos diagnósticos, sigue existiendo la necesidad de nuevas pruebas que identifiquen de manera adecuada la carga parasitaria después de un tratamiento específico (299).

5.6 TRATAMIENTO

A pesar de la alta tasa de mortalidad descrita en algunas publicaciones y en contra de nuestros resultados, seguimos sin poder evaluar la eficacia del tratamiento en este grupo de pacientes en el que ya existe una cardiopatía establecida (178).

Aunque la patogénesis de la miocardiopatía de Chagas no se comprende todavía por completo, se considera que la persistencia del parásito es determinante para la enfermedad, y, por tanto, la búsqueda de tratamiento tripanocida es un desafío hasta conseguir una alta eficacia durante la fase crónica de la enfermedad (35,300)(301). Por ello, y pese a lo que Morillo *et al.* publicó recientemente mostrando falta de eficacia del tratamiento en pacientes con cardiopatía, debemos tener en cuenta que existen modelos experimentales con animales en los que se describe una disminución de la carga parasitaria influyendo en la evolución de la miocardiopatía chagásica (302).

Hoy en día llama la atención la falta de accesibilidad del tratamiento, a pesar de los intentos de concienciación, debido en muchos casos al desconocimiento de la propia enfermedad y al coste extra que les supone dicho tratamiento (251). En nuestro estudio hasta un 32,7% de los pacientes no recibieron tratamiento, lo que indica una tasa importante de individuos sin tratar.

A pesar de la falta de eficacia y su mala tolerabilidad, continuamos utilizando como terapia principal nifurtimox y benznidazol (35). De acuerdo con esto, vemos como en nuestro estudio, prácticamente todos los pacientes salvo uno, recibieron tratamiento con

benznidazol. Como excepción, describimos dos pacientes que iniciaron nifurtimox y tras el abandono de este se completó el tratamiento con benznidazol, desconociendo su razón.

Como ya hemos dicho, la eficacia y tolerancia del tratamiento indicado está muy lejos de ser la ideal, pero es durante la infancia cuando estas características mejoran notablemente (188)(303).

De acuerdo con lo publicado en la literatura, el porcentaje de pacientes que presentan efectos secundarios es muy variable, describiéndose en torno a un 31-56% (219) o 20-30% (119)(304)(196). Esto va acorde con nuestros resultados, en los que un 24,5% de los pacientes referían algún síntoma asociado al tratamiento y, en ocasiones, se traducían en escasa adherencia, con un tiempo medio de tratamiento recibido de 35,6 días.

Una de las propuestas que se plantean para mejorar la adherencia es la optimización de la dosificación y duración del tratamiento (305)(306)(307), teniendo en cuenta que la dosis habitual administrada en adultos es de 5mg/kg de benznidazol cada 24 horas dividida en varias tomas y completando un total de 60 días como está estipulado (308).

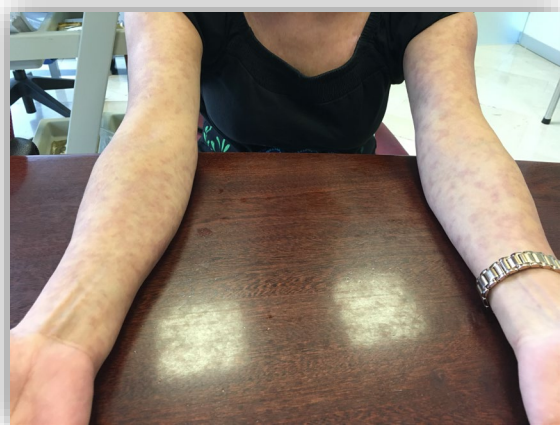


Figura 36: Exantema cutáneo en miembros superiores como efecto secundario al benznidazol.



Figura 37: Exantema cutáneo en abdomen y miembros inferiores como efecto secundario al benznidazol.

El efecto secundario más frecuente en nuestra serie de pacientes fue la reacción de hipersensibilidad como el exantema cutáneo (Figura 36 y 37) en un 61,1%, seguido de náuseas en un 13,9%. Otro efecto adverso relevante fue la presencia de polineuropatía distal en un 5,6% de los pacientes, siendo un porcentaje muy similar a lo que ya publican otras series (119), y descrito durante las últimas semanas de tratamiento con la necesidad de retirar el fármaco debido a su efecto dosis-dependiente. También cabe destacar otra reacción ya descrita y conocida como la hipertransaminasemia, que requiere un estricto control analítico y en ocasiones su retirada (304). Debemos reseñar la ausencia de pacientes con aplasia medular durante el tratamiento, que aunque su aparición es rara, si es posible según lo publicado hasta el momento (192).

5.6.1 Empleo de corticoides en pacientes con infección crónica por *Trypanosoma cruzi*

Como ya hemos mencionado previamente, hoy en día supone un reto la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Una de las razones por las que esto es necesario es la elevada aparición de efectos adversos tanto con benznidazol (BZ) como con nifurtimox siendo mal tolerados y suponiendo un abandono precoz de los tratamientos.

El efecto secundario más común según nuestra serie y lo publicado previamente en la literatura (119) es la reacción de hipersensibilidad cutánea tipo dermatitis alérgica, consistente en un eritema generalizado pruriginoso seguido posteriormente de una descamación, que aparece habitualmente en las primeras dos semanas de tratamiento. Debido a esto, el especialista se ve ante una situación comprometida teniendo en muchas ocasiones que retirar el tratamiento sin poder ofrecer otras alternativas y asumiendo el riesgo de una progresión de la enfermedad (190)(247).

Esta afección cutánea impide completar el tratamiento adecuadamente, y según algunos estudios, uno de los métodos para mejorar la tolerabilidad del fármaco pueden ser el tratamiento con dexclorfeniramina o con corticoide vía oral (219). Una opción frente a la aparición de lesiones de este tipo es tratar con corticoides a dosis bajas (prednisolona: 20 mg al día durante 10 días, y posteriormente 10 mg al día durante 10 días) sin necesidad de retirar BZ (309)(310). Como alternativa Górgolas *et al.* 2013, sugieren desde el inicio del tratamiento administrar corticoide según la siguiente terapia: metilprednisolona (MPRD) 16 mg una vez al día durante 3 días, posteriormente 8 mg una vez al día durante 3 días, y finalmente 4 mg una vez al día durante 3 días. Hemos de reseñar, que en contra de estos resultados tan positivos existen otros datos publicados en relación con el uso combinado de nifurtimox y betametasona poniendo en duda su indicación para mejorar los efectos adversos (226).

Por otro lado, efectos secundarios como la polineuropatía parecen responder también a corticoides sistémicos (119), en cuyo caso no hemos realizado ningún estudio al respecto sin poder aportar datos concluyentes hasta el momento.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente explicado debemos saber que el uso clínico de glucocorticoides es frecuente y en ocasiones de forma crónica, lo que implica unos efectos no deseados a tener en cuenta. La terapia con esta clase de medicamentos se remonta a fines de la década de 1940 (311) y es ampliamente conocido que a nivel sistémico presentan efectos sobre la inmunidad innata y adquirida predisponiendo

cuadros de infección, dependiente de la dosis del tratamiento y su duración, especialmente con patógenos bacterianos, virales y micóticos comunes. Se han realizado múltiples estudios a lo largo de los años donde se observa un aumento del riesgo de infección en pacientes que a pesar de tomar tratamiento con corticoides sufren otras comorbilidades o situaciones predisponentes: Diabetes mellitus, artritis reumatoide, largos periodos de hospitalización, ancianos, inmunodepresión, etc...(312)(313). En sentido opuesto, es altamente eficaz en el tratamiento de trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide (311,314) y ha demostrado su utilidad para prevenir graves reacciones alérgicas y de hipersensibilidad (225), por ello es por lo que se plantea su uso en las reacciones cutáneas provocadas por el tratamiento tripanocida.

Por esa razón y como objetivo de este estudio, nos propusimos estudiar la actividad “in vitro” de la MPRD frente a *Trypanosoma cruzi* y su combinación con BZ, para evaluar posibles efectos positivos o inesperados en su actividad sobre el parásito.

Los resultados obtenidos en estos estudios preliminares mostraron que, la MPRD por sí sola en concentraciones muy elevadas, no tiene actividad sobre *T. cruzi*, sin alcanzar por tanto la actividad tripanocida del BZ frente a formas extra e intracelulares del parásito.

Por otro lado los estudios de citotoxicidad inespecífica realizados a estas mismas concentraciones de MPRD y BZ no indicaron ningún efecto de toxicidad relevante sobre las células empleadas.

En el caso de los ensayos de actividad de la MPRD en combinación con la CI_{50} del BZ, observamos que con una concentración de MPRD de 2,128 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de actividad frente a amastigotes (%AA) fue de $31,61 \pm 15,33\%$, es decir, no interfirió en la actividad del BZ, teniendo en cuenta que partimos de una desviación estándar elevada. Esto también podría deberse al propio efecto de la MPRD “in vitro” a concentraciones elevadas donde su actividad frente a amastigotes fue de $21,88 \pm 4,63\%$.

En cambio, si nos fijamos en las concentraciones de 0,532 y 0,133 $\mu\text{g/ml}$ de MPRD obtuvimos porcentajes de actividad muy inferiores (%AA = $0,04 \pm 0,06\%$ y $0,27 \pm$

0,47%, respectivamente) al obtenido con la CI_{50} del fármaco de referencia, lo que indica un efecto negativo del corticoide sobre la actividad tripanocida “in vitro” del BZ, no pudiendo afirmar que el BZ conserve su efecto parasiticida en combinación con el corticoide. Sin embargo, estos datos preliminares no son concluyentes y debemos interpretarlos con cautela debido a los escasos experimentos y resultados obtenidos hasta el momento.

Otro inconveniente con el que nos enfrentamos, fue la dosis equivalente de corticoide usada en los ensayos “in vitro”. La dosis obtenida en estos ensayos fue equivalente a la utilizada vía oral en una persona estándar. Teniendo en cuenta la falta de estudios o protocolos al respecto para conocer cuáles son las cantidades estandarizadas empleadas “in vitro”, hicimos un cálculo en función de su peso molecular y volumen de distribución determinando la dosis definitiva. Una vez hecho esto, obtuvimos unas concentraciones mayores y menores con respecto a la calculada con el objeto de tener en nuestro estudio unos resultados más amplios.

Tras estos cálculos, partimos entonces de una dosis estándar de 48 mg de MPRD (equivalente a 60 mg de prednisolona), siendo mucho mayor a la aconsejada por Rassi *et al.*, pero útil para ver si utilizando concentraciones elevadas “in vitro” se ponían de manifiesto sus posibles efectos perjudiciales en combinación con BZ.

Como impedimento en este estudio, hemos de señalar la falta de información bibliográfica sobre el efecto “in vitro” de los corticoides frente a *T. cruzi*, siendo imposible comparar nuestros resultados con otros estudios experimentales. Sí existen por el contrario ensayos “in vitro” con MPRD para comprobar su efecto sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con síndrome nefrótico idiopático con unos rangos de concentración de esteroide entre 0.05 nM a 54 μ M (315), o evaluaciones experimentales del coeficiente de partición sobre los corticoesteroides en ensayos “in vivo” e “in vitro” (311). Como curiosidad, existe algún estudio “in vitro” que ha demostrado una inducción de IL-10 dependiente de la concentración de glucocorticoides de gran interés en la ámbito neumológico (316).

5.7 LIMITACIONES

En primer lugar, y considerando la enfermedad de Chagas como una de las 20 enfermedades tropicales desatendidas por la OMS, hemos de hacer hincapié en la dificultad que ha supuesto la recogida de datos a través de nuestros pacientes como consecuencia del desconocimiento, secundario a los diferentes problemas culturales, sociales y sanitarios a los que se han enfrentado cada día en su país de origen.

En relación a lo anterior, también ha sido complicado el seguimiento óptimo de estos pacientes repercutiendo en la adecuada recogida de datos, muchos obtenidos únicamente a través de la historia clínica, con pérdida de información relevante y obteniendo resultados no concluyentes. Por tanto, otra limitación ha podido ser la presencia o no de sintomatología basada únicamente en la información referida por los pacientes, teniendo que interpretar con cautela dichos resultados.

Una de las principales limitaciones del estudio es el bajo número de pacientes con diagnóstico serológico definitivo de enfermedad de Chagas, no siendo por tanto una muestra completamente representativa.

Nuestro estudio ha sido principalmente retrospectivo y observacional, por tanto las pruebas cardiológicas han podido ser evaluadas por diferentes especialistas, pudiendo suponer una interpretación diferente en función de su experiencia.

Con respecto a la realización de la RMN cardiaca, debemos tener cuenta que no se realiza de manera rutinaria ni estandarizada en la práctica habitual, por lo que esto ha conllevado un impedimento de coste y tiempo por parte del paciente.

CONCLUSIONES

6- CONCLUSIONES

- 1- La resonancia magnética cardíaca es un método útil para determinar con mayor precisión las alteraciones cardiológicas relacionadas con la enfermedad de Chagas. La realización de un mayor número de pruebas cardíacas favorece la detección de pacientes con patología estructural.
- 2- Los hallazgos obtenidos en el electrocardiograma y el ecocardiograma no siempre se correlacionan con la resonancia magnética cardíaca, como consecuencia de que estas pruebas evalúan de manera paralela diferentes aspectos como por ejemplo el sistema de conducción, la función estructural y el miocardio respectivamente, siendo necesaria su realización y un seguimiento durante largos periodos de tiempo.
- 3- La mayor parte de nuestra población infectada es originaria de Bolivia, con una estrecha asociación entre el rango de edad (≥ 50 años) y las alteraciones obtenidas en pruebas complementarias como el electrocardiograma, el ecocardiograma transtorácico o la resonancia magnética cardíaca.
- 4- Se encontró un elevado porcentaje de pacientes con alteraciones cardíacas o digestivas durante el estudio complementario, independientemente de los síntomas referidos. Esto indica la necesidad de ampliar el estudio con pruebas complementarias para detectar posible organicidad en etapas tempranas de la enfermedad.
- 5- Podemos concluir según los resultados, que existe una tendencia a la modificación de las alteraciones electrocardiográficas si comparamos aquellas que se han realizado antes y después al tratamiento, por lo que sería aconsejable hacer un seguimiento durante largos periodos de tiempo.

- 6- La PCR se negativiza en el 100% de los casos tras haber recibido el tratamiento tripanocida, lo que nos indica niveles de parasitemia bajos en pacientes con infección en fase indeterminada y crónica que han completado el régimen terapéutico.
- 7- Tras el estudio realizado, un 32,7% de la población sigue sin recibir el tratamiento indicado a pesar de no presentar afectación cardíaca u otras contraindicaciones que lo impidan.
- 8- El tratamiento tripanocida produce efectos secundarios en un 24,5% de nuestra población a estudio, induciendo mala adherencia terapéutica y sin métodos que permitan evaluar su eficacia.
- 9- El empleo de metilprednisolona “in vitro” a concentraciones elevadas, no tiene actividad frente a formas extra e intracelulares del parásito *T. cruzi*.
- 10- Los ensayos de actividad de la metilprednisolona en combinación con benznidazol frente a *Trypanosoma cruzi* indican un efecto negativo del corticoide sobre la actividad tripanocida “in vitro” del benznidazol, no pudiendo afirmar que éste conserve su efecto parasiticida en combinación con el corticoide.

BIBLIOGRAFÍA

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–8.
2. Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2011 Sep [cited 2018 Jun 12];83(3):1041–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739083>
3. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Feb 17 [cited 2018 Jun 12];101(7):2034–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766963>
4. Miles MA. The discovery of Chagas disease: progress and prejudice. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2004 Jun [cited 2018 Jun 12];18(2):247–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15145379>
5. Darwin Online: Journal of Researches [Internet]. [cited 2018 Jun 12]. Available from: http://darwin-online.org.uk/EditorialIntroductions/Freeman_JournalofResearches.html
6. Chagas C, Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1909 Aug [cited 2018 Jun 12];1(2):159–218. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=pt&tlng=pt
7. DR. JAIME RÍOS. HISTORIA [nabhm97316.pdf](#).
8. Bestetti RB, Martins CA, Cardinalli-Neto A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879–1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int J Cardiol* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2018 Jun 12];134(1):9–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185367>
9. Morel CM. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1999 Sep [cited 2018

- Jun 12];94(suppl 1):03–16. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761999000700002&lng=en&tlng=en
10. Vianna G, Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas” (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1911 [cited 2018 Jun 12];3(2):276–94. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761911000200004&lng=pt&tlng=pt
11. Velasco-Castrejón Ó, Rivas-Sánchez B. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. [Internet]. Vol. 65, Boletín médico del Hospital Infantil de México. AMERBAC; 2008 [cited 2018 Jun 12]. 57–79 p. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-11462008000100010&script=sci_abstract
12. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet. 2018;391(10115):82–94.
13. LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUX G, GRAIN J, HONIGBERG BM, et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa. J Protozool. 1980;27(1):37–58.
14. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2009 Nov [cited 2019 Jul 10];104(7):1051–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>
15. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int J Parasitol [Internet]. 1998 Jan [cited 2018 Aug 24];28(1):85–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504337>
16. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol [Internet]. 2012 Mar [cited 2019 Jul 10];12(2):240–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226704>

17. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol [Internet]. 2001;31(5–6):472–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334932> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751901001539>
18. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality. Kinetoplastid Biol Dis. 2002;1:1–21.
19. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. Clin Infect Dis. 2012;54(6):845–52.
20. Sant’Anna C, Campanati L, Gadelha C, Lourenço D, Labati-Terra L, Bittencourt-Silvestre J, et al. Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). Histochem Cell Biol [Internet]. 2005 Jul 2 [cited 2018 Jun 13];124(1):87–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995880>
21. Vickerman K. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. J Cell Sci. 1969;5:163–93.
22. de Souza W. Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. Parasitol Int [Internet]. 2007 Sep [cited 2018 Jun 13];56(3):161–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347028>
23. De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 2009;104(May):89–100.
24. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, Souza W De, Janeiro R De. Atlas didático Ciclo de vida do. 2011;50.
25. Torrós LMDP. Análisis global de la familia multigénica MASP (Mucin Associated Surface Proteins) de *Trypanosoma cruzi*. !Tesis. 2010. 230 p.
26. Pimenta PF, De Souza W. Fine structure and cytochemistry of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. J Submicrosc Cytol [Internet]. 1985 Jul [cited 2018 Jun 13];17(3):413–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4020925>
27. Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E, Schenkman S. Transcription rate

- modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2001 Jan 15 [cited 2018 Jun 13];112(1):79–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166389>
28. Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SNJ. Acidocalcisomes ? conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2018 Jun 13];3(3):251–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738951>
29. Miranda K, Benchimol M, Docampo R, de Souza W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* [Internet]. 2000 Apr 25 [cited 2018 Jun 13];86(5):373–84. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s004360050682>
30. Linder JC, Staehelin LA. Plasma membrane specializations in a trypanosomatid flagellate. *J Ultrastruct Res* [Internet]. 1977 Aug 1 [cited 2018 Jun 13];60(2):246–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022532077800695>
31. Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A Functional Aquaporin Co-Localizes with the Vacuolar Proton Pyrophosphatase to Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Sep 10 [cited 2018 Jun 13];279(37):38673–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15252016>
32. Araripe JR, Cunha e Silva NL, Leal ST, de Souza W, Rondinelli E. *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 Aug [cited 2018 Jun 13];321(2):397–402. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X04013713>
33. CDC - DPDx - American Trypanosomiasis [Internet]. [cited 2018 Jun 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>
34. Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula R V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001;31(5–6):621–7.

35. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* [Internet]. 2010;375(9723):1388–402. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
36. Yamagata Y, Nakagawa J. Control of Chagas Disease. *Adv Parasitol*. 2006;61(05):129–65.
37. Coura JR, Dias JCP, Frasc ACC, Guhl F, Lazzari JO, Lorca M, et al. Control of Chagas disease. *World Heal Organ - Tech Rep Ser*. 2002;(905):1–99.
38. Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E. Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. *Heredity (Edinb)*. 2012;108(3):190–202.
39. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000;16(9):381–7.
40. Alves MJM, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. *IUBMB Life* [Internet]. 2007 [cited 2018 Jun 18];59(4):274–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505965>
41. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(5):456–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1410150>
42. WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. Invest to overcome Glob impact neglected Trop Dis third WHO Rep neglected Dis [Internet]. 2015;191. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases
43. WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *World Heal Organ*. 2010;1–184.
44. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* [Internet]. 2010;115(1–2):14–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>
45. Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* [Internet]. 2013;19(1):34. Available from: <http://www.jvat.org/content/19/1/34>
46. WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and

- leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser [Internet]. 2012;(975):v–xii, 1–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484340>
47. Samuels AM, Clark EH, Galdos-Cardenas G, Wiegand RE, Ferrufino L, Menacho S, et al. Epidemiology of and Impact of Insecticide Spraying on Chagas Disease in Communities in the Bolivian Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8).
48. Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Martinez C, Gonzalez D, Coleman P, Davies C. Chagas disease control in Venezuela: Lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol*. 2003;19(1):44–9.
49. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015;(6):33–44.
50. Moraes-Souza H. Chagas Infection Transmission Control: Situation of Transfusional Transmission in Brazil and other Countries of Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):419–23.
51. Salvatella R, Irabedra P, Castellanos LG. Interruption of vector transmission by native vectors and “the art of the possible.” *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(1):122–30.
52. Gurevitz JM, Gaspe MS, Enriquez GF, Provecho YM, Kitron U, Gürtler RE. Intensified Surveillance and Insecticide-based Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4).
53. Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):1–15.
54. Arsuaga M. Enfermedad de chagas importada: análisis clínico-epidemiológico, diagnóstico y terapéutico en un centro de referencia. 2017;166.
55. Dubner S, Schapachnik E, Pérez Riera AR, Valero E. Chagas disease: State-of-the-art of diagnosis and management. *Cardiol J*. 2008;15(6):493–504.
56. File:Triatoma infestans.jpg - Wikimedia Commons [Internet]. [cited 2019 Dec 12]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Triatoma_infestans.jpg
57. Dias J, Silveira A, Schofield C. The Impact of Chagas Disease Control in Latin

- America - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*. 2002;97(5):603–12.
58. THE IMPORTANCE OF THE MULTIDISCIPLINARY APPROACH TO DEAL WITH THE NEW EPIDEMIOLOGICAL SCENARIO OF CHAGAS DISEASE (GLOBAL HEALTH).
59. Gurevitz JM, Gaspe MS, Enriquez GF, Vassena C V., Alvarado-Otegui JA, Provecho YM, et al. Unexpected Failures to Control Chagas Disease Vectors With Pyrethroid Spraying in Northern Argentina. *J Med Entomol* [Internet]. 2012;49(6):1379–86. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME11157>
60. Guhl F, Pinto N, Aguilera G. Sylvatic triatominae: A new challenge in vector control transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(SUPPL. 1):71–5.
61. Brown EL, Roellig DM, Gompper ME, Monello RJ, Wenning KM, Gabriel MW, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among eleven potential reservoir species from six states across the southern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2010;10(8):757–63. Available from: <http://online.liebertpub.com/prox.lib.ncsu.edu/doi/abs/10.1089/vbz.2009.0009>
62. Lambert RC, Kolivras KN, Resler LM, Brewster CC, Paulson SL. The potential for emergence of chagas disease in the United States. *Geospat Health*. 2008;2(2):227–39.
63. Almiron M, de Tomassone MM, Vera N, Acosta N, Russomando G, de Guillen I, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1998;59(3):487–91. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1998.59.487>
64. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitality infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(2):201–9.
65. Brutus L, Castillo H, Bernal C, Salas NA, Schneider D, Santalla JA, et al. Short report: Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):1044–7.

66. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: An update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):363–8.
67. Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of chagas disease in Europe: Many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol*. 2014;103(1):1–10.
68. Schmunis GA. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):93–101.
69. Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(5):476–82.
70. Portús Vinyeta M. La enfermedad de Chagas en España Chagas disease in Spain. *ARS Pharm*. 2010;50(4):195–204.
71. Dias JCP, Amato Neto V, Luna EJ de A. Artigo de Opinião / Opinion Article Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev da Soc Bras Med Trop* 44(3)375-379,. 2011;44(3):375–9.
72. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of *A??a??* palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):653–5.
73. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2017;148(3):125–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
74. AMATO NETO V, Chieffi PP, NISIDA IVV, UMEZAWA ES, SABINO EC, RUOCCO RM de SA, et al. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanossoma cruzi*. *Rev Med*. 2000;79(1):12–26.
75. Muñoz-Saravia SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: Epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev*. 2012;17(1):45–64.
76. Laura Murciaa,b, Bartolomé Carrileroa,b, Daniel Saurac, M. Asunción Iborraa,b y Manuel Segoviaa,b,d *. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas.

- 1983;31(Supl 4):3–11.
77. Gebrekristos HT, Buekens P. Mother-to-child transmission of *Trypanosoma cruzi*. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3(SUPPL1):36–40.
78. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):71–80.
79. Abrahamsohn I a, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* [Internet]. 1996;84(2):231–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932773>
80. Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas)and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun*. 1999;67(8):3864–71.
81. Gutierrez FRS, Mineo TWP, Pavanelli WR, Guedes PMM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009;104 Suppl(Gilroy 2005):236–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753479>
82. H S Rassr R, Rassi A, L WC. Chagas' Heart Disease. *Clin Cardiol*. 2000;23:883–9.
83. Marin-neto JA, Simões MV, V Á. the Chagas ' Heart Disease. *Arq Bras Cardiol*. 1999;72(3):264–80.
84. Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):463–91.
85. Manuscript A, Structures T. NIH Public Access. 2009;6(6):247–53.
86. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):377–87.
87. Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, et al. Cytokine profiling in chagas disease: Towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A benefit trial sub-study). *PLoS One*. 2014;9(3):1–8.
88. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A.

- Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res.* 2010;43(3):323–31.
89. Andrade ZA. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. *Ciba Found Symp* [Internet]. 1983 [cited 2018 Jun 29];99:214–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6416769>
90. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109–23.
91. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* 1968;(6):63–116.
92. Iantorno G, Bassotti G, Kogan Z, Lumi CM, Cabanne AM, Fisogni S, et al. The Enteric Nervous System in Chagasic and Idiopathic Megacolon. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2019 Dec 15];31(3):460–8. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000478-200703000-00016>
93. Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2004 Jun [cited 2019 Dec 15];37(3):252–60. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000300012&lng=en&tlng=en
94. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Navarro M, Monge-Maillo B, Díaz-Menéndez M, et al. Chagas disease in Latin American migrants: A Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(7):1108–13.
95. Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezas J, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: Epidemiological and clinical profile. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(7):706–12.
96. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VMC, Di Lorenzo Oliveira C, Antunes AP, Menezes MM, et al. Ten-Year incidence of chagas cardiomyopathy among asymptomatic *trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation.* 2013;127(10):1105–15.
97. Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JCP, Coura JR, Machado-Coelho GLL, et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(7):873–80.

98. Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Maciel BC, Simões MV SA. Chagas heart disease. Evidence-based cardiology. 3rd ed. Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL GB, editor. London: BMJ Books; 2010. 823–41. p.
99. Rassi Jr. A, Rassi AG, Rassi SG, Rassi Jr. L, Rassi A. Ventricular arrhythmia in Chagas' disease. Diagnosis, prognosis and therapy. Arq Bras Cardiol [Internet]. 1995;65(4):377–87. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L25340564>
100. Mendoza I, Camardo J, Moleiro F, Castellanos A, Medina V, Gomez J, et al. Sustained ventricular tachycardia in chronic Chagasic myocarditis: Electrophysiologic and pharmacologic characteristics. Am J Cardiol. 1986;57(6):423–7.
101. d'Avila A, Splinter R, Svenson RH, Scanavacca M, Pruitt E, Kasell J, et al. New perspectives on catheter-based ablation of ventricular tachycardia complicating Chagas' disease: experimental evidence of the efficacy of near infrared lasers for catheter ablation of Chagas' VT. J Interv Card Electrophysiol [Internet]. 2002;7(1):23–38. Available from: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-12391418>
102. Pinheiro De Andrade J, Marin Neto JA, Vincenzo De Paola AA, Vilas-boas F, Oliveira, Moraes GM, Bacal F, et al. I Directriz Latinoamericana para el Diagnóstico y Tratamiento de la Cardiopatía Chagásica. Resumen ejecutivo. Arq Bras Cardiol. 2011;96:434–42.
103. Costa HS, Nunes MCP, De Souza AC, Lima MMO, Carneiro RB, de Sousa GR, et al. Exercise-induced ventricular arrhythmias and vagal dysfunction in chagas disease patients with no apparent cardiac involvement. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(2):175–80.
104. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. N Engl J Med [Internet]. 2014;370(20):1899–908. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1313122>
105. Oliveira JSM, Correa De Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic chagas' heart disease. Am J Cardiol.

- 1983;52(1):147–51.
106. Carod-Artal FJ, Vargas AP, Horan TA, Nunes LGN. Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas disease. *Stroke*. 2005;36(5):965–70.
107. Freitas HFG, Chizzola PR, Paes ÂT, Lima ACP, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: Role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2005;102(2):239–47.
108. Rassi A, Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: A systematic review of observational studies. *Circulation*. 2007;115(9):1101–8.
109. Miocardiopatía dilatada - Trastornos cardiovasculares - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2019 Dec 15]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-cardiovasculares/miocardiopatías/miocardiopatía-dilatada>
110. Rassi Jr A, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2001;76(1):86–96. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2001000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
111. Muratore CA, Baranchuk A. Current and emerging therapeutic options for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6(1):593–601.
112. Chatelain E. Chagas Disease Drug Discovery. *J Biomol Screen* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Jun 29];20(1):22–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245987>
113. Rezende JM LA 1994. Chagasic Mega-visceras. In Chagas' disease and the nervous system. *Sci Publ no 547*. 1994;149–71.
114. Brandt De Oliveira R, Troncon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG. Gastrointestinal Manifestations of Chagas' Disease. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(6):884–9.
115. Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* [Internet]. 2003 Jun 26 [cited 2018 Jun 29];326(7404):1444–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829559>

116. Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2018 Jun 29];4(6):549–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357207>
117. Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2010 Aug [cited 2018 Jun 29];10(8):556–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670903>
118. Sempertegui R, Mendigaña F. Guia de Atencion Clinica de la enfermedad de Chagas 2010 (Documento Actualizado de Version Convenio. Guia. 2010;09(637):1–84.
119. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2012 Jun [cited 2018 Jun 29];26(2):275–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632639>
120. Mario J, Díaz P, Katherine L, Rey P, Esther K, Castillo R, et al. Enfermedad de chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. *Carrera Ed Monviso Portón del Tejar Bucaramanga Santander*. 2014;33(1):91–52.
121. Henry MACDA, Lerco MM, De Oliveira WK. Câncer do esôfago em paciente com megaesôfago chagásico. *Arq Gastroenterol*. 2007;44(2):151–5.
122. Silva AL Da, Giacomini RT, Quirino VDA, Miranda ES De. Proposta de classificação do megacólon chagásico através de enema opaco. *Rev Col Bras Cir* [Internet]. 2003;30(1):4–10. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912003000100002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
123. Garcia SB, Aranha AL, Garcia FRB, Basile FV, Pinto APM, De Oliveira EC, et al. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon. What is the relationship between megacolon and colonic cancer? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(2):91–3.
124. de Oliveira LC, Nascimento RS, Rocha A, Gonçalves EG, da Silva JM, de Oliveira VA, et al. [Cholelithiasis in chronic Chagase's disease patients]. *Arq Gastroenterol*

- [Internet]. [cited 2018 Jul 2];34(4):222–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629316>
125. Palmero HA, Caero TF, Iosa DJ, Bas J. Increased prevalence of cholelithiasis in chronic Chagas disease. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 1982 [cited 2018 Jul 2];42 Suppl 1:47–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6820466>
 126. Rocha A, Almeida H de O, Teixeira V de PA, Silva AM da. Prevalência da colelitíase em chagásicos crônicos necropsiados no triângulo mineiro: correlação com o megaesôfago, o megacólon e a insuficiência cardíaca. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 1985 [cited 2018 Jul 2];3–6. Available from: <http://search.bvsalud.org/cvsp/resource/es/lil-1477>
 127. Pinotti HW, Raia A, Bettarello A, Conte VP. [Incidence of cholelithiasis in patients with Chagas megaesophagus. Comparative study with non-chagasic patients]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* [Internet]. 1980 Feb [cited 2018 Jul 5];35(1):21–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6773134>
 128. Nunes MCP, Barbosa MM, Ribeiro ALP, Barbosa FBL, Rocha MOC. Ischemic cerebrovascular events in patients with Chagas cardiomyopathy: A prospective follow-up study. *J Neurol Sci* [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2018 Jul 2];278(1–2):96–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162278>
 129. Carod-Artal FJ. Policy implications of the changing epidemiology of chagas disease and stroke. *Stroke*. 2013;44(8):2356–60.
 130. Sica RE, Gonzalez Cappa SM, Sanz OP, Mirkin G. Peripheral nervous system involvement in human and experimental chronic American trypanosomiasis. *Bull Soc Pathol Exot* [Internet]. 1995 Mar [cited 2018 Jul 2];88(4):156–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640077>
 131. Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010;51(5):485–95. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/655680>
 132. Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, Campos de Carvalho AC, Spray DC, et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-Induced Heart Disease (Chagas

- Disease). *Prog Cardiovasc Dis* [Internet]. 2009;51(6):524–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2009.02.001>
133. Parise ME, Slutsker L, Hotez PJ. Neglected Parasitic Infections in the United States: Needs and Opportunities. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2014;90(5):783–5. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.13-0727>
134. Bestetti RB, Theodoropoulos TAD. A Systematic Review of Studies on Heart Transplantation for Patients With End-Stage Chagas' Heart Disease. *J Card Fail* [Internet]. 2009 Apr [cited 2018 Jul 9];15(3):249–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327627>
135. Chagas' Disease Argentine Collaborative Transplant Consortium, Casadei D. Chagas' Disease and Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2010 Nov [cited 2018 Jul 9];42(9):3354–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094779>
136. Altclas J, Sinagra A, Dictar M, Luna C, Verón MT, De Rissio AM, et al. Chagas disease in bone marrow transplantation: An approach to preemptive therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(2):123–9.
137. Angheben A, Giaconi E, Menconi M, Casazza G, Najajreh M, Anselmi M, et al. Reactivation of Chagas disease after a bone marrow transplant in Italy: first case report. *Blood Transfus* [Internet]. 2012;10(4):542–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3496236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
138. Burgos LG, Ortiz BDM, Canese A, Ojeda A, Melo M. Reactivation of Chagas Disease by Immunosuppressive Therapy in a Patient With Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Dermatopathol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2018 Jul 9];34(6):e84–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814327>
139. Pérez-Molina JA. Management of *Trypanosoma cruzi* coinfection in HIV-positive individuals outside endemic areas. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2014 Feb [cited 2018 Jul 9];27(1):9–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275694>
140. Vaidian AK, Weiss LM, Tanowitz HB. Kinetoplastid Biology and Disease. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2004;3:1–6.

141. Sartori AMC, Ibrahim KY, Nunes Westphalen E V, Braz LMA, Oliveira OC, Gakiya E, et al. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2007 Jan 18 [cited 2018 Jul 5];101(1):31–50. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/136485907X154629>
142. Chippaux J-P, Clavijo ANS, Santalla JA, Postigo JR, Schneider D, Brutus L. Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2009 Nov [cited 2018 Jul 5];15(1):87–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19968839>
143. OMS | Informe sobre la salud en el mundo 2002 - Reducir los riesgos y promover una vida sana. WHO [Internet]. 2013 [cited 2018 Jul 5]; Available from: <http://www.who.int/whr/2002/es/>
144. STROUT RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* [Internet]. 1962 Feb [cited 2018 Jul 5];48:100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13917873>
145. Luquetti A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* capivoro 2000 (1).pdf.
146. Chirinos SVCNV. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). *Guia*. 2005;1(0511):104.
147. Siqueira-Batista R, Eduardo Meneses Quintas L, Alberto Storino R. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas. *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica XLI* [Internet]. 1994;XLI(527):69–75. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/rmedica/527/art7.pdf>
148. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1983 Aug [cited 2018 Jul 5];18(2):327–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6413530>
149. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS - ppt descargar [Internet]. [cited 2019 Dec 15]. Available from: <https://slideplayer.es/slide/1034738/>
150. Picka MCM, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J.

- Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Jul 5];11(2):226–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625767>
151. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: A prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1759–64.
 152. Berrizbeitia M, Pozo A, Jorquera A, Anzoategui E, Rodolfo H. COMPARACIÓN ENTRE DOS PRUEBAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR SATÉLITE Y PCR KINETOPLASTO) PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE *Trypanosoma cruzi* EN HECES DE TRIATOMINOS. 2018;(January 2017).
 153. Brasil PEAA, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2010;10.
 154. Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2015 Sep [cited 2018 Jul 5];17(5):605–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320872>
 155. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* [Internet]. 2007 Sep [cited 2019 May 20];103(3):195–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X07001568>
 156. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(1).
 157. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4).
 158. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [Brazilian Consensus on

- Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2005 [cited 2018 May 31];38 Suppl 3:7–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416933>
159. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Jul 5];104 Suppl 1:122–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753467>
 160. Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Jul 5];104 Suppl 1:115–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753466>
 161. Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, Nunes E V., et al. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2008 Dec [cited 2018 Jul 5];13(12):1527–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18983272>
 162. Villasante Fuentes Montserrat de; Hernández Pastor Pilar. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas. 2015;11(3):141–5.
 163. Cerisola JA, Chaben MF LJ. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Médica Argentina* 49 1761-1767, 1962.
 164. Russomando G, Almirón M, Candia N, Franco L, Sánchez Z, de Guillen I. [Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2005 [cited 2018 Jul 5];38 Suppl 2:49–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482814>
 165. Diez CN, Manattini S, Zanuttini JC, Bottasso O, Marcipar I. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008;78(4):624–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385359>
 166. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 1088/2005. *Bol Of del Estado* [Internet]. 2005;31288–304. Available from: <http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/legisla>

- cion/docs/RD_1088-2005.pdf
167. Nación D. La población empadronada en España aumenta ligeramente y se sitúa en 47 , 2 millones de personas El número de extranjeros se estabiliza en 5 , 7 millones , de los cuales 2 , 4 millones son ciudadanos de la UE Población por sexo y edad Instituto Nacional d. 2012;2–6. Available from: <http://www.ine.es/prensa/np710.pdf>
 168. Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* [Internet]. 2010 Jul [cited 2018 Jul 9];115(1–2):55–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900395>
 169. Dias JCP, Coura JR, Yasuda MAS. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):123–5.
 170. Bautista-López NL, Morillo CA, López-Jaramillo P, Quiroz R, Luengas C, Silva SY, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 as diagnostic markers in the progression to Chagas cardiomyopathy. *Am Heart J* [Internet]. 2013 Apr [cited 2018 Jul 9];165(4):558–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537973>
 171. Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2012 Mar [cited 2018 Jul 9];133(3):257–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138604>
 172. Jimenez V, Kemmerling U, Paredes R, Maya JD, Sosa MA, Galanti N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: A new therapeutic target? *Phytomedicine* [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2018 Jul 9];21(11):1411–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022207>
 173. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Marin-neto JA, Maguire JH, Acquatella H, et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. *J Am Med Assoc*. 2007;298(18):2171–81.
 174. Guedes PMM, Silva GK, Gutierrez FRS, Silva JS. Current status of Chagas disease

- chemotherapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(5):609–20.
175. Chin-Hong P V., Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, et al. Screening and Treatment of Chagas Disease in Organ Transplant Recipients in the United States: Recommendations from the Chagas in Transplant Working Group. *Am J Transplant* [Internet]. 2011 Apr [cited 2018 Jul 10];11(4):672–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401868>
176. Bern C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2012 Aug [cited 2018 Jul 10];25(4):450–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22614520>
177. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [Brazilian Consensus on Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2005 [cited 2018 Jul 5];38 Suppl 3:7–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416933>
178. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(14):1295–306. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1507574>
179. Coura JR, De Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3–24.
180. Viotti R, Alarcón De Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):635–9.
181. Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA, et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop* [Internet]. 2013 Aug [cited 2018 Jul 10];127(2):126–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643518>
182. Laboratorio Elea S.A.C.I.F. y A. ¿Cuál es la causa de la enfermedad de Chagas-Mazza? 2012;0–1. Available from: <http://www.elea.com/uploads/Modules/Productos/abarax-501340-00.pdf>
183. Andrade JP de, Marin Neto JA, Paola AAV de, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of

- Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2018 Jul 10];96(6):434–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789345>
184. Fonseca Berzal CR. Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de chagas. 2016;1. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=108861>
 185. OMS (Organización Mundial de la Salud). Medicamento Utilizados en las Enfermedades Parasitarias. 1991. p. 96.
 186. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, et al. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2003 Aug 13 [cited 2018 Jul 11];52(3):441–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917253>
 187. Cançado JR. Criteria of Chagas Disease Cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):331–5.
 188. Estani SS, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(4):526–9.
 189. Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, et al. Feasibility, Drug Safety, and Effectiveness of Etiological Treatment Programs for Chagas Disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year Experience of Médecins Sans Frontières. Gürtler RE, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2009 Jul 7 [cited 2018 Jul 11];3(7):e488. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582142>
 190. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* [Internet]. 2006 May 16 [cited 2018 Jul 11];144(10):724–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702588>
 191. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa

- Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. [cited 2018 Jul 11];40(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486245>
192. Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim Nov*. 2009;32(9):2444–57.
 193. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2009 Mar 10 [cited 2018 Jul 17];7(2):157–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254164>
 194. Lerch M, Keller M, Britschgi M, Kanny G, Tache V, Schmid DA, et al. Cross-reactivity patterns of T cells specific for iodinated contrast media. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2018 Jul 17];119(6):1529–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412404>
 195. Pinazo M-J, Munoz J, Posada E, Lopez-Chejade P, Gallego M, Ayala E, et al. Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2018 Jul 11];54(11):4896–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823286>
 196. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Sao Avilés A, et al. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Jul 11];59(10):6125–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195525>
 197. Pinazo M-J, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Jan [cited 2018 Jul 11];57(1):390–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114763>
 198. Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Jul 11];30(6):289–98. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776300>
199. LAMPIT Comprimidos [Internet]. [cited 2018 Jul 11]. Available from: <http://www.farmaciasahumada.cl/fasa/MFT/PRODUCTO/P10470.HTM>
 200. Streiger ML, del Barco ML, Fabbro DL, Arias ED, Amicone NA. [Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. [cited 2018 Jul 11];37(5):365–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361952>
 201. Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Jul 11];104(4):549–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722074>
 202. Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2018 Jul 11];51(10):e69–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932171>
 203. Pinazo M-J, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman A-G, Viotti R-J, et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2014 Apr 12 [cited 2018 Jul 11];12(4):479–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24621252>
 204. Okamoto EE, Sherbuk JE, Clark EH, Marks MA, Gandarilla O, Galdos-Cardenas G, et al. Biomarkers in *Trypanosoma cruzi*-Infected and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10).
 205. Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(11):1347–56.
 206. Hunt SA. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guideli. *Circulation* [Internet].

- 2005;112(12):e154–235. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.167586>
207. Braga JCV, Reis F, Aras R, Costa ND, Bastos C, Silva R, et al. Clinical and therapeutics aspects of heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2006;86(4):297–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680295>
208. Guidobaldi F, May-Concha IJ, Guerenstein PG. Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *J Physiol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Jul 11];108(2–3):96–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24836537>
209. Scanavacca MI, Sosa EA, Lee JH, Bellotti G, Pileggi F. [Empiric therapy with amiodarone in patients with chronic Chagas cardiomyopathy and sustained ventricular tachycardia]. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 1990 Jun [cited 2018 Jul 11];54(6):367–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2288524>
210. Garillo R, Tadeu O, Oscar G, Fernando O. Cardiodesfibrilador Implantable como Prevención Secundaria en la Enfermedad de Chagas . Los Resultados del Estudio Latinoamericano ICD - LABOR. 2004;17(4):169–77.
211. Gali WL, Sarabanda A V., Baggio JM, Ferreira LG, Gomes GG, Marin-Neto JA, et al. Implantable cardioverter-defibrillators for treatment of sustained ventricular arrhythmias in patients with Chagas’ heart disease: comparison with a control group treated with amiodarone alone. *Europace* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2018 Jul 11];16(5):674–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481778>
212. PEREIRA FTM, ROCHA EA, MONTEIRO MDPM, NETO ACR, DAHER EDF, SOBRINHO CRMR, et al. Long-Term Follow-Up of Patients with Chronic Chagas Disease and Implantable Cardioverter-Defibrillator. *Pacing Clin Electrophysiol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Jul 11];37(6):751–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467488>
213. CARDINALLI-NETO A, BESTETTI RB, CORDEIRO JA, RODRIGUES VC. Predictors of All-Cause Mortality for Patients with Chronic Chagas’ Heart Disease Receiving Implantable Cardioverter Defibrillator Therapy. *J Cardiovasc Electrophysiol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2018 Jul 11];18(12):1236–40. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900257>
214. Bocchi EA, Fiorelli A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2001 Jun [cited 2018 Jul 11];71(6):1833–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426756>
 215. Herbella FAM, Aquino JLB, Stefani-Nakano S, Artifon ELA, Sakai P, Crema E, et al. Treatment of achalasia: lessons learned with Chagas' disease. *Dis Esophagus* [Internet]. 2008 Aug [cited 2018 Jul 11];21(5):461–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430188>
 216. Pinazo MJ, Cañas EG, Elizalde JI, García M, Gascón J, Gimeno F, et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol*. 2010;33(3):191–200.
 217. Garcia RLS, Matos BMR de, Féres O, Rocha JJR da. Surgical treatment of Chagas megacolon. Critical analysis of outcome in operative methods. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2008 [cited 2018 Jul 11];23 Suppl 1:83–92; discussion 92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516454>
 218. Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEAA, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(5):1261–6.
 219. Gorgolas M, Robles I, Cabello A, Perez-Tanoira R, Peremarch CPJ, Fernandez-Roblas R, et al. The use of steroids to prevent cutaneous reactions to benznidazole in patients with Chagas disease. *Pathog Glob Heal*. 2013;107(3):157–60.
 220. Fan PT, Yu DT, Clements PJ, Fowlston S, Eisman J, Bluestone R. Effect of corticosteroids on the human immune response: comparison of one and three daily 1 gm intravenous pulses of methylprednisolone. *J Lab Clin Med* [Internet]. 1978 Apr [cited 2019 May 22];91(4):625–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/76667>
 221. Pappas DA, Hooper MM, Kremer JM, Reed G, Shan Y, Wenkert D, et al. Herpes Zoster Reactivation in Patients With Rheumatoid Arthritis: Analysis of Disease

- Characteristics and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs. *Arthritis Care Res* (Hoboken) [Internet]. 2015 Dec [cited 2020 Feb 6];67(12):1671–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018115>
222. Becker DE. Basic and clinical pharmacology of Glucocorticosteroids. *Anesth Prog*. 2013;60(1):25–32.
 223. Chatham WW, Kimberly RP. Treatment of lupus with corticosteroids. *Lupus* [Internet]. 2001 Mar 2 [cited 2019 May 22];10(3):140–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/096120301675075008>
 224. Fauci AS, Dale DC, Balow JE. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med* [Internet]. 1976 Mar [cited 2019 May 22];84(3):304–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/769625>
 225. Newmark JL, Mehra A, Singla AK. Radiocontrast media allergic reactions and interventional pain practice--a review. *Pain Physician* [Internet]. 2012;15(5):E665-75. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22996860&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/5858D46F-44BB-41EE-9588-AE885762FC86>
 226. Rassi A, Neto VA, Siqueira AF, Filho FF, Amato VS, Rassi GG, et al. Treatment of chronic Chagas' disease with an association of nifurtimox and corticoid. *Rev da Soc* 2002;35(6):547–50.
 227. Torrico F, Gascon J R. E1224—Results of proof of concept clinical trial in patients with chronic indeterminate Chagas disease. *ASTMH 62nd Annual Meeting*. In Washington DC;
 228. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. *Cruzi* Carriers. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 Feb 28 [cited 2018 Jul 12];69(8):939–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28231946>
 229. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, et al. Chagas cardiomyopathy: Usefulness of ekg and echocardiogram in a Non-Endemic country. *PLoS One*. 2016;11(6):1–13.

230. Surawicz B, Childers R, Deal BJ, Gettes LS. AHA/ACCF/HRS Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram: Part III: Intraventricular Conduction Disturbances: A Scientific Statement From the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee., Circulation [Internet]. 2009;119(10):e235–40. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191095>
231. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. J Am Soc Echocardiogr [Internet]. 2015 Jan [cited 2019 Feb 1];28(1):1-39.e14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25559473>
232. Villar R. Escala NYHA (New York Heart Association). Med Interna (Bucur) [Internet]. 1994;2. Available from: <https://meiga.info/escalas/nyha.pdf%0Ahttp://meiga.info/escalas/NYHA.pdf>
233. Kuschnir E. Criterios de clasificacion de la cardiopatia chagastica.
234. Diagn T, En S, Complicaciones LAS, Asociadas N, Enfermedad LA, En DEC, et al. Adrián sánchez montalvá.
235. Drossman DA, Dumitrascu DL. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. J Gastrointestin Liver Dis [Internet]. 2006 Sep [cited 2019 Oct 7];15(3):237–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013448>
236. Buckner FS, Verlinde CLMJ, Flamme ACLA. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against Trypanosoma cruzi Using Parasites Expressing α -Galactosidase. 1996;40(11):2592–7.
237. CAMARGO EP. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. [cited 2019 Apr 3];6:93–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14177814>
238. Fonseca-Berzal C, Palmeiro-Roldán R, Escario JA, Torrado S, Arán VJ, Torrado-Santiago S, et al. Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution

- profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. *Exp Parasitol* [Internet]. 2015;149:84–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.002>
239. Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing β -galactosidase. *Parasitol Res* [Internet]. 2005 Mar 29 [cited 2019 May 2];95(4):296–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682334>
 240. Fonseca-Berzal C, Merchán Arenas DR, Romero Bohórquez AR, Escario JA, Kouznetsov V V., Gómez-Barrio A. Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing β -galactosidase. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2019 May 2];23(17):4851–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899616>
 241. SANFORD KK, EARLE WR, LIKELY GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1948 Dec [cited 2019 May 21];9(3):229–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18105872>
 242. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* [Internet]. 2006 Jul 28 [cited 2019 May 2];99(2):103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506080>
 243. Fonseca-Berzal C, Rojas Ruiz FA, Escario JA, Kouznetsov V V., Gómez-Barrio A. In vitro phenotypic screening of 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives as putative anti- *Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2019 May 2];24(4):1209–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461296>
 244. Valerio L, Roure S, Sabrià M, Balanzó X, Vallès X, Serés L. Clinical, electrocardiographic and echocardiographic abnormalities in Latin American migrants with newly diagnosed chagas disease 2005-2009, Barcelona, Spain. *Eurosurveillance*. 2011;16(38):1–6.
 245. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(5):456–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1410150>

246. Meymandi SK, Forsyth CJ, Soverow J, Hernandez S, Hernandez DS, Montgomery SP, et al. Prevalence of chagas disease in the Latin American-born population of Los Angeles. *Clin Infect Dis*. 2017;64(9):1182–8.
247. Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, et al. Trypanocide Treatment of Women Infected with *Trypanosoma cruzi* and Its Effect on Preventing Congenital Chagas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11).
248. Gobbi F, Angheben A, Anselmi M, Postiglione C, Repetto E, Buonfrate D, et al. Profile of *Trypanosoma cruzi* Infection in a Tropical Medicine Reference Center, Northern Italy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(12):5–10.
249. Del Pino M, Coll O. Enfermedad de Chagas, transmisión materno-fetal y experiencia recogida en nuestro centro. *Enfermedades Emergentes*. 2006;8(SUPPL. 1):37–9.
250. Muñoz-Vilches MJ, Salas J, Cabezas T, Metz D, Vázquez J, Soriano MJ. Cribado de Chagas en mujeres gestantes latinoamericanas. Experiencia en el Poniente Almeriense. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2019 Sep 30];30(7):380–2. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X11003764?via%3Dihub>
251. Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants Graphical abstract HHS Public Access. *Acta Trop* [Internet]. 2016;156(Mc 0507):68–78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5155706/pdf/nihms753683.pdf>
252. Pinazo M-J, Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop* [Internet]. 2015 Nov [cited 2019 Sep 30];151:16–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187358>
253. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 8]; Available from: <https://www.who.int/chagas/en/>
254. Ventura-Garcia L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascón J, Aldasoro E, et al. Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(9).

255. Minneman RM, Hennink MM, Nicholls A, Salek SS, Palomeque FS, Khawja A, et al. Barriers to Testing and Treatment for Chagas Disease among Latino Immigrants in Georgia. *J Parasitol Res* [Internet]. 2012 [cited 2019 Sep 30];2012:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23326646>
256. Ribeiro AL, Rocha MO. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(3):301–14.
257. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. Chagas Heart Disease: An Update. *Am J Med* [Internet]. 2015;128(11):1251.e7-1251.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.04.036>
258. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. *Clin Cardiol*. 2015;38(9):565–9.
259. Bestetti RB, Restini CBA. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. *Int J Cardiol* [Internet]. 2014;176(2):309–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.07.112>
260. RASSI A. Implantable Cardioverter-Defibrillators in Patients with Chagas Heart Disease: Misperceptions, Many Questions and the Urgent Need for a Randomized Clinical Trial. *J Cardiovasc Electrophysiol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2019 Oct 2];18(12):1241–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971129>
261. Bilder CR, Goin JC. Gastrointestinal involvement in Chagas disease. *NeuroGastroLATAM Rev*. 2018;1(4):168–79.
262. Maguire JH, Hoff R, Sherlock I, Guimarães AC, Sleigh AC, Ramos NB, et al. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: Prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation*. 1987;75(6):1140–5.
263. Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Ávila LF, et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: A marker of disease severity. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2005;46(8):1553–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.067>
264. DIAS E, LARANJA FS, MIRANDA A, NOBREGA G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* [Internet]. 1956 Dec

- [cited 2019 Oct 3];14(6):1035–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13383798>
265. Dias JC, Kloetzel K. The prognostic value of the electrocardiographic features of chronic Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. [cited 2019 Oct 3];10(3):158–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4982469>
 266. Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Prat JG, Herrera RN, et al. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(2):99–106.
 267. Ianni BM, Arteaga E, De Frimm CC, Barretto ACP, Mady C. Chagas' heart disease: Evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. *Arq Bras Cardiol*. 2001;77(1):59–62.
 268. Nicolau JC, Garzon SAC. Electrocardiography in Chagas disease 95. 1995;113(2):802–13.
 269. Carrasco HAG, Barboza JS, Inglessis G, Fuenmayor A, Molina C. Left ventricular cineangiography in Chagas' disease: Detection of early myocardial damage. *Am Heart J* [Internet]. 1982 Sep [cited 2019 Oct 4];104(3):595–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7113900>
 270. Valerio L, Roure S, Sabrià M, Balanzó X, Vallès X, Serés L. Clinical, electrocardiographic and echocardiographic abnormalities in Latin American migrants with newly diagnosed chagas disease 2005-2009, Barcelona, Spain. *Eurosurveillance*. 2011;16(38):1–6.
 271. SOLVD Investigators, Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB, Cohn JN. Effect of Enalapril on Mortality and the Development of Heart Failure in Asymptomatic Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions. *N Engl J Med* [Internet]. 1992 Sep 3 [cited 2019 Oct 3];327(10):685–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1463530>
 272. Gurgel CBFM, Ferreira MCF, Mendes CR, Coutinho E, Favoritto P, Carneiro EF. A lesão apical em cardiopatas chagásicos crônicos: Estudo necroscópico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):709–12.

273. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Jul 10];373(14):1295–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323937>
274. de Vries LJ, Martirosyan M, van Domburg RT, Wijchers SA, Géczy T, Szili-Torok T. Coupling interval variability of premature ventricular contractions in patients with different underlying pathology: an insight into the arrhythmia mechanism. *J Interv Card Electrophysiol*. 2018;51(1):25–33.
275. Rassi Jr. A, Rassi AG, Rassi SG, Rassi Jr. L RA. SciELO Brasil - www.scielo.br Freqüência e grau da extra-sístolia ventricular à eletrocardiografia dinâmica (sistema Holter de 24 horas) na doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol* 1991; 57(supl C) C146 [Internet]. [cited 2019 Oct 3]; Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000079&pid=S0066-782X200200100000100021&lng=pt
276. Rassi A, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and Validation of a Risk Score for Predicting Death in Chagas' Heart Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Aug 24 [cited 2018 Nov 15];355(8):799–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928995>
277. Ribeiro ALP, Lombardi F, Sousa MR, Lins Barros MV, Porta A, Costa Val Barros V, et al. Power-law behavior of heart rate variability in Chagas' disease. *Am J Cardiol* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2019 Oct 3];89(4):414–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835922>
278. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas ' Disease Case 17-2011: A Woman with a Mass in the Breast and Overlying Skin Changes. 2011;2011–2.
279. Barretto ACP, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, de Lourdes Higuchi M, et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J* [Internet]. 1986 Feb [cited 2019 Oct 4];111(2):307–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3946173>
280. Torreão JA, Ianni BM, Mady C, Naia E, Rassi CH, Nomura C, et al. Myocardial tissue characterization in Chagas' heart disease by cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* [Internet]. 2015;17(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12968-015-0200-7>

281. Uellendahl M, Siqueira MEM de, Calado EB, Kalil-Filho R, Sobral D, Ribeiro C, et al. Cardiac Magnetic Resonance-Verified Myocardial Fibrosis in Chagas Disease: Clinical Correlates and Risk Stratification. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2016;460–6. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20160168>
282. Combellas I, Puigbo JJ, Acquatella H, Tortoledo F, Gomez JR. Echocardiographic features of impaired left ventricular diastolic function in Chagas's heart disease. *Br Heart J* [Internet]. 1985;53(3):298–309. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=481759&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
283. Viotti RJ. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart* [Internet]. 2004;90(6):655–60. Available from: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/hrt.2003.018960>
284. Patel AR, Lima C, Parro A, Arsenault M, Vannan MA, Pandian NG. Echocardiographic analysis of regional and global left ventricular shape in Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol* [Internet]. 1998 Jul 15 [cited 2018 Jun 12];82(2):197–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9678291>
285. Silva SDA, Gontijo ED, Amaral CFS. Case-control study of factors associated with chronic Chagas heart disease in patients over 50 years of age. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(7):845–51.
286. Caeiro TF, Madoery RJ, Salomone OA. Influence of Male Sex and of Parasitaemia Detected By. *Baseline*. 2003;1186–90.
287. Pinazo MJ, Lacima G, Elizalde JI, Posada EJ, Gimeno F, Aldasoro E, et al. Characterization of Digestive Involvement in Patients with Chronic *T. cruzi* Infection in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):1–7.
288. De Souza DHS, Da Glória Merheb Vaz M, Fonseca CR, Luquetti A, Filho JR, De Oliveira EC. Current epidemiological profile of Chagasic megaesophagus in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):316–21.
289. Pinazo M-J, Ignacio Elizalde J, de Jesús Posada E, Gascón J. Co-infection with

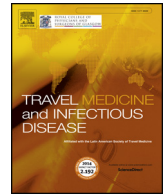
- two emergent old pathogens: *Trypanosoma cruzi* and *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2019 Oct 7];28(10):751–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X10002211>
290. Anand AC, Sashindran VK, Mohan L. Gastrointestinal problems at high altitude. *Trop Gastroenterol* [Internet]. [cited 2019 Oct 7];27(4):147–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17542291>
 291. Patiño F, Ponce R, Lora J, Aguilar C, Ríos Dalenz J. Megacolon at high altitude. *Acta Gastroenterol Latinoam* [Internet]. 1983 [cited 2019 Oct 7];13(4):699–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6680261>
 292. Geraix J, Ardisson LP, Marcondes-Machado J, Pereira PCM. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas disease. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2007 Aug [cited 2019 Oct 7];11(4):411–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873995>
 293. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2001 Sep [cited 2019 Oct 7];1(2):92–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871482>
 294. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Monge-Maillo B, Faro M V., López-Vélez R. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: Prevalence and methods for early diagnosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011;105(1):25–9.
 295. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease. *Glob Heart* [Internet]. 2015 Sep [cited 2019 Oct 7];10(3):139–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26407508>
 296. Remes-Troche JM, Torres-Aguilera M, Antonio-Cruz KA, Vazquez-Jimenez G, De-La-Cruz-Patiño E. Esophageal motor disorders in subjects with incidentally discovered Chagas disease: a study using high-resolution manometry and the Chicago classification. *Dis Esophagus* [Internet]. 2014 Aug [cited 2019 Oct 7];27(6):524–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088758>
 297. Riera C. Educación continuada en el laboratorio clínico. *DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS*. Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona. Ed Cont Lab Clín. 2012;22–41.

298. Sabino EC, Ribeiro AL, Lee TH, Oliveira CL, Carneiro-Proietti AB, Antunes AP, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. Eur J Heart Fail [Internet]. 2015;17(4):416–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678239> <http://doi.wiley.com/10.1002/ejhf.220>
299. Verçosa AFA, Lorena VMB, Carvalho CL, Melo MFAD, Cavalcanti MGA, Silva ED, et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. J Clin Lab Anal [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2019 Oct 8];21(5):271–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcla.20186>
300. Brasileira S, Tropical DM, Marin-neto JA, Simões MV, Junior AR. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. 2013;46(February):536–41.
301. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int J Parasitol. 2001;31(5–6):550–4.
302. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. [cited 2019 Oct 9];30(2):139–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148337>
303. Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. Pediatrics [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2018 May 31];127(1):e212–8. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-1172>
304. Andrade JP De, Antonio J, Neto M, Amato A, Paola V De, Vilas-boas F, et al. I Directriz Latinoamericana para el Diagnóstico y Tratamiento de la Cardiopatía Chagásica. Resumen Ejecutivo. Arq Bras Cardiol. 2011;96(6):434–42.
305. Altcheh J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Marson ME, et al. Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. Dumonteil E, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014 May 22 [cited 2019 Oct

- 9];8(5):e2907. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002907>
306. Soy D, Aldasoro E, Guerrero L, Posada E, Serret N, Mejía T, et al. Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Jun [cited 2019 Oct 9];59(6):3342–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824212>
307. Álvarez MG, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JC, et al. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 Oct 9];60(2):833–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596935>
308. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [Brazilian Consensus on Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2005 [cited 2019 Feb 1];38 Suppl 3:7–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416933>
309. Rassi A, Dias JCP, Marin-Neto JA, Rassi A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*. 2009;95(7):524–34.
310. Raasi A, Luquetti AO. Specific Treatment For *Trypanosoma Cruzi* Infection (Chagas Disease). 2003;117–25.
311. Ayyar VS, DuBois DC, Nakamura T, Almon RR, Jusko WJ. Modeling corticosteroid pharmacokinetics and pharmacodynamics, Part II: Sex differences in methylprednisolone pharmacokinetics and corticosterone suppressions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;370(2):327–36.
312. Strangfeld A, Eveslage M, Schneider M, Bergerhausen HJ, Klopsch T, Zink A, et al. Treatment benefit or survival of the fittest: what drives the time-dependent decrease in serious infection rates under TNF inhibition and what does this imply for the individual patient? *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2019 Oct 10];70(11):1914–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791449>
313. Stuck AE, Minder CE, Frey FJ. Risk of infectious complications in patients taking glucocorticosteroids. *Rev Infect Dis* [Internet]. [cited 2019 May 22];11(6):954–63.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2690289>
314. Kirwan JR. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 1995;333(3):142–7.
315. Cuzzoni E, De Iudicibus S, Stocco G, Favretto D, Pelin M, Messina G, et al. In vitro sensitivity to methyl-prednisolone is associated with clinical response in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Pharmacol Ther*. 2016;100(3):268–74.
316. Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response—The role of glucocorticoids and Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Apr 30];120(2–3):86–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096007601000083X>

ANEXO



Original article

Chagas' heart disease: Descriptive analysis of 141 patients in a hospital of Madrid, Spain

Irene Carrillo Acosta^{a,b}, Ramón Pérez-Tanoira^{a,c,*}, Laura Prieto-Pérez^{a,b},
 Alfonso Cabello Úbeda^{a,b}, Beatriz Álvarez Álvarez^a, Patricia Atencio Antoranz^a,
 Manuel Fernández Guerrero^{a,b}, Ricardo Fernández Roblas^{b,d}, Miguel Orejas^e, Marta Tomás^f,
 Irune Cariñanos^g, Miguel Górgolas^{a,b}

^a Division of Infectious Diseases, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^b Department of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^c Department of Microbiology, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Spain

^d Department of Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^e Department of Cardiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^f Department of Radiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^g Department of Digestive, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Chagas' disease

Trypanosoma cruzi

electrocardiogram

Echocardiogram

Cardiac magnetic resonance imaging

ABSTRACT

Background: Spain is the European country with the highest number of *Trypanosoma cruzi* infected patients. Due to the cardiac complications that these patients can develop, it is of paramount importance to evaluate the value of the different heart diagnostic tools.

Method: In this observational study, we describe the main characteristics and data from electrocardiogram, chest X-ray, echocardiogram and cardiac magnetic resonance imaging (MRI) of 141 patients with Chagas' disease attended in a tertiary university hospital in Madrid from 2009 to 2018.

Results: A total of 50 patients (35.4%) had at least one abnormal cardiac test: 34.2% altered electrocardiogram (40/117), 24.5% altered echocardiogram (27/110) and 9.2% abnormal cardiac MRI (13/41). Of those 13 with a pathological MRI, 53.8% had normal results for any other test. The most frequent alterations observed were hypokinesia with decreased LVEF (left ventricular ejection fraction), dilatation of cavities and cardiac fibrosis.

Two thirds of patients with abnormal cardiac test were asymptomatic. Altered echocardiogram was found in 43.8% of patients ≥ 50 years compared to 16.6% under 50 years ($p = 0.003$).

Conclusions: A transthoracic echocardiogram and a MRI of the heart added a 23.8% increment in diagnosing cardiac pathological findings.

1. Introduction

It is estimated that there are between 8 and 10 million people in the world infected by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease (CD). *T. cruzi* is the leading cause of infectious myocarditis [1], causing approximately 20,000 deaths per year.

Chagas' disease is recognized a neglected tropical disease by the WHO, and it is one that affects a large number of people [2]. In the seven southernmost American countries, the disease causes the loss of

about 752,000 working days [3]. The estimated annual global economic burden of the disease is \$627.5 million in health-care costs and 806,170 disability-adjusted life-years; 10% of this burden affects non-endemic countries [4].

Migrations from endemic to non-endemic countries have led to the appearance of the disease in USA and Europe, particularly in Spain. Most patients infected by *T. cruzi* are asymptomatic and are classified as carriers of the indeterminate form of CD. They could transmit *T. cruzi* through blood transfusion, tissue transplantation, or congenitally from

* Corresponding author. Department of Microbiology, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, A-3, s/n, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

E-mail addresses: irene.carrillo@fjd.es (I.C. Acosta), rptanoira@salud.madrid.org (R. Pérez-Tanoira), lauraprieto83@gmail.com (L. Prieto-Pérez), acabello@fjd.es (A.C. Úbeda), balvarez@quironsalud.es (B. Álvarez Álvarez), patricia.atencio@quironsalud.es (P.A. Antoranz), mlfernandez@fjd.es (M. Fernández Guerrero), rfernandez@fjd.es (R. Fernández Roblas), morejaso@fjd.es (M. Orejas), mtomas@fjd.es (M. Tomás), icarinanos@fjd.es (I. Cariñanos), mgorgolas@fjd.es (M. Górgolas).

<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101690>

Received 5 July 2019; Received in revised form 24 February 2020; Accepted 19 April 2020

1477-8939/ © 2020 Published by Elsevier Ltd.

mother to newborn [5,6]. Thus, CD has become a global health problem which entails a new challenge that demands standardized guidelines for the management and follow-up of patients with chronic *Trypanosoma cruzi* infection [2].

The most common route of transmission is vectorial through triatomine bugs. The disease has an acute phase, that usually resolves spontaneously, difficult to diagnose and hardly ever seen in non-endemic areas; and a chronic phase that is present in 30–40% of infected cases, that is characterized by cardiac and/or digestive affection [7]. The indeterminate form of Chagas' disease is classically characterized by the absence of symptoms, physical signs or electrocardiographic and radiographic evident abnormalities, in patients with a positive serology for *Trypanosoma cruzi* [8].

Chagas disease can cause damage to the digestive system leading to achalasia and, more frequently, to constipation. Transient gastrointestinal symptoms (dysphagia and retrosternal pain, abdominal pain and diarrhoea) can occur during the acute phase of infection [9,10]. However, significant gastrointestinal manifestations of Chagas' disease are mainly associated with the chronic phase of infection. Oesophageal and colonic manifestations are characteristics in patients with CD, and patients with megaesophagus also have an increased risk of oesophageal cancer [11].

The cardiac disease burden attributable to Chagas' disease in immigrant population from endemic areas is an emerging concern. In a study performed in Spain, Valerio et al. showed that ECG and echocardiogram were important tools for the detection of alterations suggestive of Chagas cardiomyopathy in a large proportion of newly diagnosed migrant patients [12]. Nowadays, the echocardiogram is the standard method for detecting impaired ventricular function in suspected myocarditis, even in asymptomatic or subclinical cases [13,14]. Cardiovascular magnetic resonance imaging (MRI) can be helpful for the assessment of left ventricular size and function or myocardial fibrosis (MF), which seems to correlate with the severity of the disease. This has been evaluated by some researchers including Rochitte CE et al., who studied fifty-one patients with CD detecting that MF was present in 20% of them without clinical cardiac signs or symptoms of dysfunction [15].

The main objective of this study was to describe the epidemiological and clinical characteristics of patients infected with *T. cruzi*, attending to a tertiary Spanish hospital, and to evaluate the potential added value of cardiac MRI to other conventional cardiac diagnostic tools for the diagnosis of chronic heart CD.

2. Methods

2.1. Study population

This observational and descriptive study includes all patients with a positive serology for *T. cruzi* antibody detection, attended in the University Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain) between 2009 and 2018. The main clinical and epidemiological data were collected directly from patients or from their records. All cases were serological confirmed by two different techniques. In our study, patients with CD were classified according to the New York Heart Association (NYHA) Functional Classification [16]. Cardiac involvement was assessed by electrocardiogram, echocardiogram, 24 h- Holter monitoring, and cardiac magnetic resonance imaging (MRI); Gastrointestinal involvement was assessed through barium oesophagogram, barium enema and oesophageal manometry.

2.1.1. Cardiological study

Patients were asked for symptoms of cardiac arrhythmia or failure. It was considered cardiomegaly when the cardiac silhouette in the thorax X-ray was bigger than 0.5 of the amplitude of the thorax. The ECG abnormalities attributed to CD were: right bundle branch block, left anterior fascicular block, left posterior fascicular block, left bundle

branch block, Q waves, ST-T changes, first or second degree atrioventricular (AV) block, complete AV block, low QRS voltage, sinus bradycardia < 50 beats per minute, atrial fibrillation or flutter, and pacemaker rhythm [17,18]. The transthoracic echocardiogram was performed with two systems: Philips iE33, two or three dimension visualization, and Philips HD 15, and evaluated by experts echocardiographers. The normal reference values were considered according to the guidelines of the European Association of Cardiovascular Imaging [19]. Echocardiography was considered abnormal when the following findings were observed: EF < 50%, alteration of relaxation, segmental alteration of contractility, dilation of cavities (left ventricular end diastolic diameter > 55 mm), presence of aneurysm, or valvular involvement.

The magnetic resonance study was carried out with two devices: Philips Intera 1.5 T and Siemens Magnetom 3 T. According to the standardized protocol, single photo sequences are made on thoracic area in pure axial plane. Cinemas in short axis, two cameras, three cameras, four cameras and left ventricle outflow tract, T2 stir sequences in short axis and hurry sequences (Half Fourier Acquisition Single Turbo Spin Echo) t2 in axial, coronal and sagittal plane. To evaluate late realism, contrast is administered with the device according to the usual protocol.

Patients with CD were classified according to the ECG, NYHA, and thorax x-ray results, as defined by Kuschnir [20]. In this classification, the stage 0 refers to those patients who are asymptomatic with normal electrocardiogram and normal chest radiography; stage 1 includes a description of the electrocardiographic alteration; stage 2 refers to those with some alterations in the ECG together with cardiomegaly observed in the chest radiograph, and in spite of it are asymptomatic. And finally, stage 3, which includes those patients who have alterations in both cardiological tests and have symptoms suggestive of heart failure.

Alternatively, our patients were classified considering the ECG, MRI and echocardiographic findings into four groups using our modification of the Echostage Classification. Patients in group 1 had normal ECG, normal echocardiography and normal MRI; patients in group 2 had ECG abnormalities and normal echocardiography and MRI; patients in group 3 had impaired echocardiography, irrespective of ECG and MRI; patients in group 4 had MRI abnormalities irrespective of ECG and echocardiographic findings.

2.2. Serological diagnosis

Laboratory diagnosis of *T. cruzi* infection was established by two serological ELISA assays: one with colorimetric detection (Chagas Alere Freedom) and other with chemiluminescence detection (Architect Chagas Reagent Kit) following international recommendations and per manufacturer's instructions. A case was considered positive if both tests were positive, while discordance was termed as an indeterminate case. Indeterminate cases were subjected to a lateral flow chromatographic immunoassay (onSite Chagas Ab Combo Rapid Test, Importadora Americana S.A.).

On the other hand, a commercially available Real-Time PCR assay targeting satellite DNA (SatDNA) of *T. cruzi* (RealCycler CHAG), in peripheral blood, was used.

2.3. Statistical analysis

Data were analysed with IBM® SPSS® Statistics (v.21.0.0.0) software. In the descriptive study, continuous variables were represented as the mean \pm standard deviation (SD), median and range while frequencies and percentages were calculated for qualitative variables. Univariate analysis was performed using Chi-square test or Fisher's test for qualitative variables. A P-value of < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

2.4. Ethical considerations

The study protocol was approved by the Ethical Review Board of IIS-Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain) and procedures were carried out in accordance with the ethical standards laid down in the Helsinki Declaration as revised in 2000. All procedures of the study were done as standard clinical practice and the information of the patients was anonymized and de-identified prior to analysis.

3. Results

3.1. Epidemiological data

A total of 141 patients (p) were included in the study. Patients chiefly came from Bolivia (92.2%, n = 130), followed by Paraguay (3.5%, n = 5), Ecuador (2.1%, n = 3) and El Salvador, Brazil and Peru (0.7%, n = 1 each). The mean age was 41.9 ± 12.2 (IQR 13.0 years) (range: 6–75 years; median 40). The majority were females (80.9%) and only twenty-seven patients (19.1%) were males. Fifty-two patients (36.9%) self-reported family history of Chagas infection.

The transmission route was supposed to be vectorial in 136 (96.5%), vertical in 4 (2.8%) and transfusional in only 1 (0.7%). The principal baseline characteristics of patients are shown in Table 1.

Table 1
Baseline characteristics of the study population (n = 141).

Age (median)	40 IQR:36–49.25)
Gender	
Female	114 (81%)
Male	27 (19.0%)
Nationality	
Bolivia	130 (92.2%)
Paraguay	5 (3.5%)
Ecuador	3 (2.1%)
El Salvador	1 (0.7%)
Brazil	1 (0.7%)
Peru	1 (0.7%)
Transmission route	
Vectorial	136 (96.5%)
Vertical	4 (2.8%)
Transfusion	1 (0.7%)
Hypertension	10 (7.1%)
Diabetes mellitus	2 (1.4%)
Dyslipidemia	12 (8.5%)
Symptomatology	
Asymptomatic	74 (52.5%)
Cardiac	34 (24.1%)
Digestive	29 (20.5%)
Other	4 (2.8%)
Cardiac alterations	
Cardiomegaly	4 (2.8%)
Pacemaker carrier	4 (2.9%)
Abnormal ECG (n = 117)	40 (34.2%)
Abnormal echocardiography (n = 110)	27 (24.5%)
Abnormal cardiac MRI (N = 41)	13 (31.7%)
Functional Classification	
NYHA I	139 (98.6%)
NYHA II	2 (1.4%)
Kuschnir classification (n = 100)	
0	64 (64.0%)
I	31 (31.0%)
II	4 (4.0%)
III	1 (1.0%)
Modified echostage classification (N = 41)	
Normal ECG, echocardiography and MRI	14 (34.1%)
Abnormal ECG, normal echocardiography and cardiac MRI	11 (26.8%)
Abnormal echocardiography	3 (7.3%)
Abnormal cardiac MRI	13 (31.7%)

ECG: electrocardiogram.

MRI: magnetic resonance imaging.

NYHA: New York Heart Association.

Table 2

Electrocardiographic and echocardiographic findings in the study population.

Electrocardiogram (n = 141 patients)	
Left axis	14 (9.9%)
Sinus bradycardia	10 (7.1%)
Right bundle branch block (RBBB)	6 (4.3%)
Left anterior fascicular block (LAFB)	6 (4.3%)
ST/T changes	6 (4.3%)
Q waves abnormal	4 (2.8%)
Atrio-ventricular block (first degree)	2 (1.4%)
Pacemaker rhythm	2 (1.4%)
Low voltage	1 (0.7%)
Left bundle branch block (LBBB)	1 (0.7%)
Sinus tachycardia	1 (0.7%)
Echocardiography (n = 110 patients)	
Valvulopathy	18 (12.8%)
Alteration of relaxation/diastolic dysfunction	13 (9.2%)
Cavities dilatation	8 (5.7%)
Hypokinesia	5 (3.5%)
Aneurysm	1 (0.7%)
Segmental alterations	0
Left ventricular ejection fraction (LVEF) < 60	14 (87.2%)

LVEF: Left ventricular ejection fraction.

The most frequent cardiac symptoms referred by 34 patients (24.1%) were as follow: chest pain 10 (7.1%), palpitations 8 (5.7%), dizziness 6 (4.3%), syncope 4 (2.8%), dyspnoea 4 (2.8%), oedema 1 (0.7%), orthopnoea 1 (0.7%). Thirty two patients (22.7%) complained of digestive symptoms, being the most frequent constipation (8.5%), heartburn (6.4%), abdominal pain and dysphagia (2.8% each). Four patients (2.8%) presented symptoms different from those classified as cardiological or digestive, such as headache, epilepsy or arthralgias.

A total of 50 individuals (35.5%) showed cardiological dysfunctions detected by at least one of the performed cardiac tests, being a high percentage asymptomatic patients (66.0%). On the other hand, 91 patients (64.5%) had normal cardiac tests and the majority was clinically asymptomatic [74; (81.3%)] ($p = 0.042$). The Kuschnir classification was established in 100 patients, most of them were classified as Kuschnir stage 0 or I (95.0%). Only 5 patients showed moderate cardiomegaly or symptoms of heart failure being classified as Kuschnir stage II or III.

Electrocardiographic and echocardiographic alterations are shown in Table 2.

Out of 41 MRI performed, 13 cases showed alterations (9.2%), being the most predominant findings global or segmental hypokinesia with decreased associated LVEF, dilatation of cavities, mainly affecting the atrium and left ventricle, or gadolinium retention suggestive of cardiac fibrosis (9.75%, n = 4 each one), as we can see in Fig. 1(B and C, D). MRI also revealed signs of hypertrabeculation or septal hypertrophy (4.88%, n = 2) and apical aneurysm (2.4%, n = 1) (Fig. 1A). Monitoring of MRI with initial pathological findings was performed in only 2 patients and it was normalized after treatment in both cases. One of them presented initially mild global hypokinesia with systolic dysfunction of the left ventricle of 48% (LVEF) and in the another one was detected the presence of possible subepicardial retention foci in the lateral and apex face in relation to myocarditis.

Electrocardiogram alterations and myocardial damage, evaluated by echocardiogram and MRI, were predominant in males compared to females (56.5% vs 28.7% for ECG and 45.8% vs 22.47% for myocardial damage) ($p = 0.012$ and 0.023 for ECG and myocardial damage respectively). Myocardial damage and altered ECG was predominant on patients ≥ 50 years compared to under 50 years (46.9% vs 19.8% for myocardial damage and 57.6% vs 25.0% for altered ECG) ($p = 0.004$ and ≤ 0.001 respectively for myocardial damage and altered ECG).

In Table 3 the relationship between altered findings in cardiac tests and patient symptoms is shown.

Only 2 patients out of 17 (11.7%) who had a single cardiological

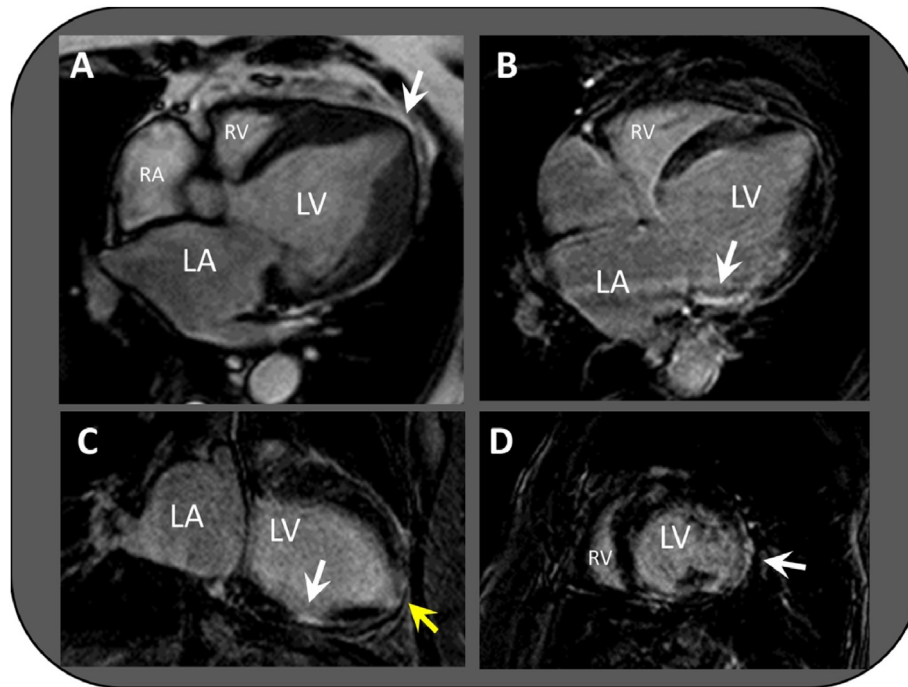


Fig. 1. Cardiac magnetic resonance imaging.

Table 3

Relationship between altered findings in cardiac tests and patient symptoms.

CARDIAC TEST	ECHOCARDIOGRAM		p-value
	Altered n = 27	Normal n = 77	
Altered ECG	18 (66.6%)	20 (26.0%)	≤0.001*
ECHOCARDIOGRAM			
	Altered n = 12	Normal n = 29	
Altered Cardiac MRI	9 (75.0%)	4 (13.8%)	< 0.001*
ECG + ECHOCARDIOGRAM			
	Altered n = 7	Normal n = 16	
Altered Cardiac MRI	6 (85.7%)	2 (12.5%)	0.002*
Non-cardiological symptoms (33)			
	11 (33.3%)	16 (20.8%)	0.161
Altered Echocardiogram			
	13 (39.4%)	27 (32.1%)	0.457
Altered ECG			
	5 (31.2%)	8 (32.0%)	0.960
Altered Cardiac MRI			

ECG: electrocardiogram.

MRI: Magnetic Resonance Imaging.

Statistical test used: Chi-square test or Fisher's test.

*Statistically significant means $p < 0.05$.

test performed, were found to have alterations; and 48 patients out of 103 (46.6%) who had more than one of these tests showed cardiac alterations ($p = 0.007$). Specifically, 23 of 64 (35.9%) patients who had ECG and echocardiogram showed any alteration, and 25 of 39 (64.1%) patients that with ECG, echocardiogram and MRI presented some structural cardiac finding.

A total of 84 patients were treated with Benznidazole (BZ) (59.6%), one patient with Nifurtimox (NX) (0.7%) and two patients received first BZ and later NX (1.4%). Fifty-nine patients did not suffer any significant side effect (70.2%), however 29.8% referred drug related side effects including: rash 16 (19.0%), nausea 5 (6.0%), distal polyneuropathy 2

(2.4%), and arthralgias 2 (2.4%). Other less common side effects were anaemia, asthenia, and muscular pain (1.2% each).

The PCR for *T. cruzi* was positive in 24 cases out of 98 in whom it was performed. After treatment PCR became negative in all cases. None of the patients with a positive PCR had any alteration in their cardiological tests performed and patients who had an altered Kuschir test (grade I-III) were associated with a negative result in this molecular technique (Table 4).

4. Discussion

The most remarkable result emerging from our data is that a significant number of asymptomatic patients with Chagas' diseases, 23.8%, showed myocardial damage assessed by echocardiography and/or MRI. After performing more cardiological tests, we obtained different results, which were considered significant. This was associated with an increase in the number of cases with structural cardiac pathology. Cardiac MRI was a useful tool which provided information of myocardial damage in combination with echocardiogram, even in patients without pathological results for EKG [21]. In our view, these results emphasize the usefulness of performing various cardiological diagnostic techniques, even in asymptomatic patients, to detect important findings such as myocardial fibrosis in the early stages of the

Table 4

Relationship between the result of the PCR before the treatment and the result of the cardiological tests.

CARDIAC TEST	PCR		p-value
	POSITIVE	NEGATIVE	
Altered ECG	9 (42.8%)	21 (35%)	0.60
Altered Cardiac MRI	1 (50%)	5 (33.3%)	≤1
Altered Echocardiogram	2 (9.5%)	12 (21.4%)	0.327
KUSCHIR	7 (33.3%)	22 (71%)	0.011*
ECOSTAGE	3 (50%)	21 (72.4%)	0.352

MRI: Magnetic Resonance Imaging.

Statistical test used: Chi-square test or Fisher's test.

*Statistically significant means $p < 0.05$.

disease [15].

We identified a significantly higher prevalence of Chagas' disease in young women from Bolivia as a consequence of the expanding primary prevention of congenital transmission [5,17,18]. We observed that males, and also patients over 50 years, had significantly more cardiologic dysfunctions and myocardial damage. This is in good agreement with previous findings in the literature [22–24]. These results suggest gender and age-related differences in inflammatory cardiomyopathy of Chagas' disease [17,25–28].

Chest pain, as the most common clinical symptom, concurs well with previous research from Bestetti et al., in which oppressive central-thoracic pain was found in up to 15% of patients [29]. Chest pain should always be taken into account due to its association with myocardial pathology [4,30]. In our study, we observed a high percentage of patients with cardiac symptoms despite having a normal NYHA functional class and the study of cardiologic tests without alterations. In our cohort, pacemakers were implanted only in four cases. In the future, it would be interesting to compare the efficacy of the treatment in our patients with established Chagas heart disease with respect to healthy patients as Morillo et al. [31].

Even though in our study, left axis deviation, sinus bradycardia, valvulopathy and diastolic dysfunction were the most frequent cardiologic alterations, in contrast to Rassi et al. (2010) and Pérez-Molina et al. (2018), they are consistent with those of right bundle branch block, left anterior fascicular block, ST-T changes, abnormal Q waves continue being frequent.

The lack of agreement in the results obtained from the comparison between myocardial damage, evaluated by echocardiogram and MRI, compared to cardiologic alterations defined by ECG are in line with the study of Viotti et al. (2006). They found 7.8% of patients infected by *T. cruzi*, with a normal ECG and the presence of segmental lesions on echocardiography [32]. Our results showed a higher percentage, 14.5% of myocardial damage with normal ECG. However, this study is in contradiction with earlier findings from Sánchez-Montalvá et al. (2016), who described an association between the presence of atrial arrhythmia and the prolonged duration of QRS with an abnormal echocardiogram [17]. Our results could be explained following the conclusions from Combellas et al. (1985) and Rigou et al. (2001) [33,34]. According to them, early isovolumic relaxation and left ventricular abnormalities may precede systolic compromise, which may become apparent in later stages of the disease.

Echocardiogram and MRI are more accurate, to detect cardiac involvement in asymptomatic chagasic patients, than the electrocardiogram, showing abnormalities in many cases where there are no electrocardiographic alterations. Since each of the different cardiologic tests evaluate different aspects, such as the conduction system, structural function or myocardium, and they are based on simple, non-invasive and painless methods, it is necessary to perform them all and follow-up the patient for long periods of time [15,35–37]. MRI also revealed in two of the patients (4.88%) pathological retention of the contrast, due to a possible artifact or previous episode of myocarditis. These observed alterations disappeared when the MRI was performed a second time.

We found an important poor adherence to trypanocidal therapy due to the significant number of adverse reactions, mainly cutaneous, produced by benznidazole or Nifurtimox [7,38–40]. PCR is useful for the monitoring and quantification of parasite DNA in patients with Chagas' disease, particularly during the acute phase. However, a high variability in sensitivity and specificity exists between different PCR tests [41,42]. *Trypanosoma cruzi* PCR positivity has been associated with presence and severity of cardiomyopathy, suggesting a direct role of parasite persistence in disease pathogenesis [41]. Contrary to the results obtained in our study, PCR does not seem to give any signal on the degree of cardiac involvement, because those who had an altered Kuschnir test were associated with a negative PCR and those who had a positive PCR did not present cardiac alterations. This shows the little

use of PCR to observe possible organic alterations at this level. Due to the questionable usefulness of PCR for post-treatment follow-up and development of cardiac disease severity in patients with chronic Chagas' disease, it is crucial the identification of markers of disease progression [42]. Morillo et al. (2015) concluded that, among patients with established Chagas' cardiomyopathy, benznidazole treatment significantly reduced the detection of circulating parasites by PCR but did not reduce cardiac clinical progression [37]. In this context, the knowledge about antibody production and its influence during the disease progression might clarify better strategies for prognostic and earlier treatments for cardiomyopathy in Chagas disease.

We observed a negativization of PCR in all patients for whom post-treatment follow-up was performed, this is a much higher percentage of negativization with respect to that reported in the BENEFIT study [37], as they found Chagas' disease reactivation in the subsequent follow-up. Real time PCR assays are useful to differential diagnosis of Chagas' reactivation [43].

Finally, all our patients have a low average follow-up, 3.4 ± 2.17 years (range 0–7.6 years), compared to other studies with a mortality rate of up to 30.7% and a follow-up of 7.9 ± 3.2 years [27]. This is partly due to a weak awareness on the part of patients and professionals to follow up, regardless of whether they remain asymptomatic or do not present any alteration in the complementary tests. This could be an important issue particularly in imported cases, such as those presented in this study. Chagas' disease has spread beyond its geographical boundaries because of migration of patients from endemic areas, presenting also different form of transmission, including the congenital [44] and transfusional forms, becoming a global problem in non-endemic zone countries [45]. The prevalence of infection in Latin American migrants residing in Europe is estimated at around 4.2% (95% CI 2.2–6.7), highlighting the Bolivian origin [46]. Spain is considered the second country in the non-endemic area with the highest number of cases of Chagas disease, after the United States, where it is estimated that approximately 300,000 people may have been infected by *T. cruzi* [47]. This entails an emerging problem in our country, that constitutes a new challenge for the implementation of standardized guidelines on the management and follow-up of patients with chronic infection with *Trypanosoma cruzi* because these patients can remain asymptomatic for many years.

One of the most important limitations of our study is the number of patients lost during follow-up, and the low number of them for whom cardiac follow-up was performed and compared before and after treatment. Another important factor to consider is the large number of very preliminary alterations in cardiologic tests that may go unnoticed and, therefore, do not imply a broader and more exhaustive cardiologic study. Finally, symptoms suggestive of visceral involvement may change during follow-up and they are perceived by patients in very different ways, making the evaluation of symptoms difficult, on the other hand we cannot distinguish between Chagas' disease-associated cardiac pathology and other non-Chagasic cardiologic dysfunctions.

5. Conclusions

Echocardiogram, and MRI should be incorporated as a routine resource of diagnosis in patients with Chagas' disease, considering the high percentage of cases in which cardiac participation is detected in asymptomatic patients in the early stages of the disease with normal EKG. Cardiac MRI is a suitable tool which provided information of myocardial damage and represents the best method for early ventricular dysfunction in combination with echocardiogram.

Considering that immigrants coming to Spain in seek of opportunities have a great mobility, it would be necessary a multidisciplinary approach, with strong links between hospitals and primary healthcare professionals. This will allow to perform longer prospective studies to evaluate the evolution of the disease out of endemic areas and to find

new tools that help to evaluate cardiologic damage and the efficacy of treatment.

Because of the small sample size and the long-term evolution of chagasic cardiomyopathy, prospective studies, involving a greater number of patients followed for longer periods of time, should be conducted to confirm these results.

Author summary

A significant excess in prevalence of patients with Chagas' heart diseases and the absence of symptoms and markers for evaluating the outcome and therapeutic efficacy in this disease, shows the need to perform a systematic cardiac monitoring in the general population with Chagas' disease.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRediT authorship contribution statement

Irene Carrillo Acosta: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Data curation. **Ramón Pérez-Tanoira:** Methodology, Writing - original draft, Data curation, Formal analysis, Supervision, Project administration. **Laura Prieto-Pérez:** Visualization, Resources, Writing - review & editing. **Alfonso Cabello Úbeda:** Resources, Writing - review & editing. **Beatriz Álvarez Álvarez:** Resources, Writing - review & editing. **Patricia Atencio Antoranz:** Writing - review & editing. **Manuel Fernández Guerrero:** Resources. **Ricardo Fernández Roblas:** Resources, Validation. **Miguel Orejas:** Resources, Visualization, Validation. **Marta Tomás:** Resources, Visualization, Validation. **Irene Cariñanos:** Resources, Visualization. **Miguel Górgolas:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Project administration, Writing - original draft.

References

- [1] Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343:1388–98. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431908>.
- [2] Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2013;19:34. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-34>.
- [3] Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 2010;375:239–47. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61422-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61422-7).
- [4] Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 2013;13:342–8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1).
- [5] Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018;391:82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- [6] Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med* 2015;373:456–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>.
- [7] Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375:1388–402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- [8] Pinheiro De Andrade J, Marin Neto JA, Vincenzo De Paola AA, Vilas-boas F, Oliveira, Moraes GM, Bacal F, et al. I Directriz Latinoamericana para el Diagnóstico y Tratamiento de la Cardiopatía Chagásica. Resumen ejecutivo. *Arq Bras Cardiol* 2011;96:434–42.
- [9] Rassi A, de Rezende JM. Estudo clíptico-radiológico do esófago e dos cistões na fase aguda da doença? a de chagas com relato de tríplices casos de remissão espontânea de aperistalse do esófago do grupo i. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:70–5.
- [10] Souza-Lima R de C, Barbosa M, das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento A da S, Ferreira JMBB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46:510–4. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1367-2013>.
- [11] Brandt De Oliveira R, Troncon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG. Gastrointestinal manifestations of chagas' disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93:884–9.
- [12] Valerio L, Roure S, Sabrià M, Balanzó X, Vallès X, Serés L. Clinical, electrocardiographic and echocardiographic abnormalities in Latin American migrants with newly diagnosed chagas disease 2005–2009, Barcelona, Spain. *Euro Surveill* 2011;16:1–6. <https://doi.org/10.2807/ese.16.38.19971-en>.
- [13] Nieminen MS, Heikkilä J, Karjalainen J. Echocardiography in acute infectious myocarditis: relation to clinical and electrocardiographic findings. *Am J Cardiol* 1984;53:1331–7. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(84\)90089-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(84)90089-4).
- [14] Pinamonti B, Alberti E, Cigalotto A, Dreas L, Salvi A, Silvestri F, et al. Echocardiographic findings in myocarditis. *Am J Cardiol* 1988;62:285–91.
- [15] Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Ávila LF, et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1553–8. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.067>.
- [16] Villar R. Escala NYHA (New York heart association). *Med Interna (Bucur)* 1994;2.
- [17] Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, et al. Chagas cardiomyopathy: usefulness of ekg and echocardiogram in a Non-Endemic country. *PLoS One* 2016;11:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157597>.
- [18] Surawicz B, Childers R, Deal BJ, Gettes LS. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: Part III: intraventricular conduction disturbances: a scientific statement from the American heart association electrocardiography and arrhythmias committee. *Circulation* 2009;119:e235–40. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191095>.
- [19] Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American society of echocardiography and the European association of cardiovascular imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2015;28:1–39. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2014.10.003>.
- [20] Kuschner E. Criterios de clasificación de la cardiopatía chagásica n.d.
- [21] Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease case 17-2011: a woman with a mass in the breast and overlying skin changes 2011:2011–2.
- [22] Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Marin-neto JA, Maguire JH, Acquatella H, et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States A systematic review. *J Am Med Assoc* 2007;298:2171–81. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>.
- [23] Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, et al. Trypanocidal treatment of women infected with trypanosoma cruzi and its effect on preventing congenital chagas. *PLoS Neglected Trop Dis* 2014;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>.
- [24] Jr ANA, Jerosch-herold M, Melo RL, Mauricio AV, Rocha L, Torreão JA, et al. Chagas' heart disease: gender differences in myocardial damage assessed by cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 2016;1–8. <https://doi.org/10.1186/s12968-016-0307-5>.
- [25] Silva SDA, Gontijo ED, Amaral CFS. Case-control study of factors associated with chronic Chagas heart disease in patients over 50 years of age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:845–51.
- [26] Caeiro TF, Madoery RJ, Salomone OA. Influence of male sex and of parasitaemia detected by. *Baseline* 2003. 1186–90.
- [27] Rassi A, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in chagas' heart disease. *N Engl J Med* 2006;355:799–808. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053241>.
- [28] Hidron AJ, Gilman RH, Justiniano J, Blackstock AJ, LaFuente C, Selum W, et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *PLoS Neglected Trop Dis* 2010;4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000688>.
- [29] Bestetti RB, Restini CBA. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. *Int J Cardiol* 2014;176:309–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.07.112>.
- [30] Abuhab A, Trindade E, Aulicino GB, Fujii S, Bocchi EA, Bacal F. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. *Int J Cardiol* 2013;168:2375–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.262>.
- [31] Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2015;373:1295–306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>.
- [32] Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:724–34.
- [33] Combellas I, Puigbo JJ, Acquatella H, Tortoledo F, Gomez JR. Echocardiographic features of impaired left ventricular diastolic function in Chagas's heart disease. *Br Heart J* 1985;53:298–309.
- [34] Rigou DG, Gullone N, Carnevali L, De Rosa AF. [Asymptomatic Chagas disease. Electrocardiographic and echocardiographic findings]. *Medicina (B Aires)* 2001;61:541–4.
- [35] Viotti RJ. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart* 2004;90:655–60. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.018960>.
- [36] Patel AR, Lima C, Parro A, Arsenault M, Vannan MA, Pandian NG. Echocardiographic analysis of regional and global left ventricular shape in Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;82:197–202.
- [37] Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2015;373:1295–306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>.
- [38] Laura Murcia b, Bartolomé Carrilero a, Daniel Saurac M. Asunción Iborra, b y Manuel Segovia a, b, d *. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas 1983;31:3–11.
- [39] Hernández C, Teherán A, Flórez C, Ramírez JD. Comparison of parasite loads in serum and blood samples from patients in acute and chronic phases of Chagas disease. *Parasitology* 2018;145:1837–43. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000598>.
- [40] Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Trop Dis*

- 2011;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>.
- [41] Sabino EC, Ribeiro AL, Lee TH, Oliveira CL, Carneiro-Proietti AB, Antunes AP, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. *Eur J Heart Fail* 2015;17:416–23. <https://doi.org/10.1002/ehf.220>.
- [42] Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2015;15:1347–56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00243-1).
- [43] Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Neglected Trop Dis* 2009;3. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000419>.
- [44] Rodari P, Angheben A, Gennati G, Trezzi L, Bargiggia G, Maino M, et al. Congenital Chagas disease in a non-endemic area: results from a control programme in Bergamo province, Northern Italy. *Trav Med Infect Dis* 2018;25:31–4. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.04.011>.
- [45] Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010;115:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>.
- [46] Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Trop Dis* 2015;9:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>.
- [47] Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Clin Infect Dis* 2012;54:845–52. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>.